

FERNANDO LÓPEZ GALLEGO



**DESARROLLO DE NUEVOS CATALIZADORES ENZIMÁTICOS PARA LA
PRODUCCIÓN DIRECTA DE CEFALOSPORINAS SEMISÍNTETICAS A PARTIR DE
CEFALOSPORINA C**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid**

**DIRECTORES
JOSE MANUEL GUISÁN SEIJAS
ROBERTO FERNÁNDEZ-LAFUENTE
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica
C.S.I.C., Madrid**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Madrid, 2006**

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Antibióticos β-lactámicos. Una útil herramienta para luchar contra las infecciones.	1
1.2. Catalizadores biológicos implicados en procesos de producción de Cefalosporinas.	4
<i>1.2.1. D-aminoácido oxidasa. La enzima que modifica la CFC</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2. Glutaril acilasa. La enzima que libera el 7-ACA</i>	<i>6</i>
<i>1.2.3. Penicilina G acilasa, la enzima que sintetiza.</i>	<i>11</i>
1.3. Estilización enzimática. Una herramienta necesaria para el uso de enzimas como biocatalizadores industriales.	13
<i>1.3.1. Métodos sencillos y eficientes de inmovilización de enzimas en soportes porosos.</i>	<i>15</i>
<i>1.3.1.1. Inmovilización covalente multipuntual a través de la química del glutaraldehído.</i>	<i>17</i>
<i>1.3.1.2. Inmovilización covalente sobre soportes epoxi-acrílicos.</i>	<i>19</i>
<i>1.3.1.3. Inmovilización en soportes epóxido heterofuncionales. Muchos caminos de inmovilización bajo una misma idea.</i>	<i>20</i>
<i>1.3.1.4. inmovilización dirigida y rigidificación orientada de proteínas</i>	<i>22</i>
<i>1.3.2. Modificación química de proteínas.</i>	<i>25</i>
<i>1.3.3. Agregados enzimáticos. Inmovilización sin soporte sólido.</i>	<i>27</i>
1.4. Biotransformaciones con sistemas multienzimáticos. Síntesis de antibióticos semi-sintéticos.	29
<i>1.4.1. Conversión enzimática de Cefalosporina C en 7-ACA.</i>	<i>29</i>
<i>1.4.2. Acilación enzimática del 7-ACA. Antibióticos semi-sintéticos cefalosporánicos.</i>	<i>31</i>

3. OBJETIVOS	39
3. MATERIALES	41
4. MÉTODOS	43
4.1. Producción y purificación de PGA y GAC.	
<i>4.1.1. Diálisis de PGA y GAC comerciales.</i>	43
<i>4.1.2. Expresión y purificación de PGA de E.coli y GAC de Pseudomonas SY-77.</i>	43
4.2. Ensayos de actividad enzimática	43
4.3. Análisis de proteínas.	46
4.4. Preparación de soportes utilizados para la inmovilización de enzimas.	46
<i>4.4.1. Soportes activados con grupos amino primarios.</i>	46
<i>4.4.2. Soportes activados con grupos glutaraldehído.</i>	47
<i>4.4.3. Inmovilización de enzimas en diferentes soportes.</i>	47
4.5 Inmovilización de enzimas en diferentes soportes.	48
<i>4.5.1. Inmovilización enzimática sobre soportes glioxil agarosa.</i>	48
<i>4.5.2. Inmovilización enzimática en soportes activados con glutaraldehído.</i>	49
<i>4.5.3. Inmovilización enzimática sobre agarosa activada con bromuro de cianógeno.</i>	49
<i>4.5.4. Inmovilización de enzimas en resinas epoxi-acrílicas</i>	49

<i>4.5.5. Adsorción iónica de GAC en diferentes soportes activados con grupos aminos primarios.</i>	50
<i>4.5.6. Inmovilización de PGA en soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol.</i>	50
4.6. Entrecruzamiento con glutaraldehído de derivados de GAC adsorbidos ionicamente en soportes activados con aminos primarios	51
4.7. Propiedades de los diferentes derivados enzimáticos.	51
<i>4.7.1. Estabilidad térmica</i>	51
<i>4.7.2. Capacidad de carga enzimática de diferentes derivados.</i>	52
<i>4.7.3. Resistencia mecánica de diferentes derivados.</i>	52
<i>4.7.4. Constantes cinéticas de GAC con GL-7-ACA y -cetoadipil 7-ACA como sustratos.</i>	53
<i>4.7.5. Inhibición de distintos ácidos en la actividad hidrolasa de GAC hacia diferentes sustratos.</i>	53
4.8. Modificación de la superficie de GAC mediante aminación química de la misma.	54
<i>4.8.1. Aminación de las preparaciones inmovilizadas de GAC.</i>	54
<i>4.8.2. Aminación de la preparación soluble de GAC</i>	54
4.9. Preparación de agregados enzimáticos de GAC.	55
<i>4.9.1. Preparación de agregados enzimáticos precipitados con polietilenglicol (PEG) y entrecruzados con glutaraldehído (CLEA-PEG).</i>	55
<i>4.9.2. Preparación de agregados enzimáticos co-precipitados con PEI en presencia de polietilenglicol (PEG) y entrecruzados con glutaraldehído (CLEA-PEIPEG).</i>	55
<i>4.9.3. Preparación de agregados enzimáticos precipitados con PEI y entrecruzados con glutaraldehído (CLEA-PEI).</i>	56
4.10. Estudio de la cantidad de agua en el interior de los diferentes agregados enzimáticos.	56
4.11. Conversión de CFC a 7-ACA en dos reactores (Proceso en 2 pasos).	56
4.12. Conversión directa de CPC a 7-ACA en un solo reactor (Proceso en un solo paso).	57
4.13. Síntesis Termodinámicamente controlada (STC) de Cefazolina	58

4.14. Síntesis cinéticamente controlada de ácido 7-[(1-hidroxil-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil-Δ^3-cefem-4-carboxílico, un precursor del Cefamandol.	58
5. RESULTADOS	60
5.1. Estabilización de Glutaril acilasa (GAC) mediante diferentes técnicas físico-químicas.	60
<i>5.1.1. Estabilización de GAC mediante diferentes métodos de inmovilización.</i> (López-Gallego, y col., J. Biotechnol., 2004, 111, 219)	60
<i>5.1.2. Mejora de la inmovilización-estabilización de GAC en soportes glioxil agarosa (Gx-agarosa)</i> (López-Gallego y col., J. Biotechnol., 2005, 116, 1)	69
<i>5.1.3. Mejora de la actividad/estabilidad de biocatalizadores de GAC mediante la co-agregación con polímeros aminados.</i> (López-Gallego y col., Biomacromolecules., 2005, 6, 1839)	72
5.2. Desarrollo de un nuevo sistema para la producción de 7-ACA desde Cefalosporina C (CFC) en ausencia de peróxido de hidrógeno.	77
<i>5.2.1. Conversión de CFC a 7-ACA en dos reactores. Un proceso bi-enzimático.</i>	78
<i>5.2.2. Características de los biocatalizadores para ser empleados en un proceso de hidrólisis de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno</i>	80
<i>5.2.3. Conversión de CFC a 7-ACA en dos reacciones mediante un sistemas tri-enzimático</i>	82
<i>5.2.4. Conversión directa de CFC a 7-ACA en un solo reactor mediante un sistemas tri-enzimático</i>	83
5.3. Mejora de la actividad α-cetoadipil acilasa de GAC mediante técnicas de biología molecular.	84
<i>5.3.1. Caracterización cinética de la actividad de GAC nativa y mutantes en la hidrólisis de α-cetoadipil 7-ACA.</i>	84
<i>5.3.2. Efecto de la mejora en la actividad α-cetoadipil 7-ACA acilasa en la conversión directa de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno.</i>	85

5.4. Inmovilización-rigidificación orientada de PGA en soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol.	87
5.5. Síntesis de Cefalosporinas semisintéticas catalizadas por PGA	93
<i>5.5.1. Síntesis cinéticamente controlada. Mejora de la Tasa Vs/Vh1.</i>	93
<i>5.5.2. Síntesis cinéticamente controlada (SCC) en sistemas bifásicos.</i>	101
5.6. Transformación de Cefalosporina C en Cefalosporinas semi-sintéticas.	104
6. DISCUSIÓN.	107
6.1. Desarrollo de nuevos biocatalizadores insolubles muy estables de GAC.	107
<i>6.1.1. Estabilización de GAC mediante técnicas de inmovilización covalente multipuntual.</i>	107
<i>6.1.2. Propiedades de los mejores derivados inmovilizados de GAC. Comparación con las preparaciones comerciales.</i>	111
<i>6.1.3. Aminación química de GAC. Una solución para lograr una unión covalente multipuntual intensa de GAC en soportes glioxil-agarosa.</i>	112
<i>6.1.4. Agregados proteicos en presencia de PEI. Estabilización de GAC sin soporte.</i>	113
6.2. Conversión directa de Cefalosporina C a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno.	116
6.3. Estabilización orientada de la PGA en unos nuevos soportes bifuncionales glioxil-tiol	121
6.4. Mejoras en la Síntesis de Cefalosporinas semi-sintéticas.	122
<i>6.4.1. Sistema de Inmovilización, un variable importante para el comportamiento en síntesis de la PGA.</i>	123
<i>6.4.2. El medio de reacción puede influir en las propiedades sintéticas del catalizador</i>	123
<i>6.4.3. El metanol y su efecto en la estructura 3D de la PGA para mejorar las propiedades catalíticas de esta.</i>	124
<i>6.4.4. Adsorción del núcleo antibiótico, la clave, el metanol</i>	126
<i>6.4.5. Hidrólisis del antibiótico, la solución del problema esta en dos fases.</i>	127

6.5. Obtención de Cefalosporinas semi-sintéticas desde Cefalosporina C mediante un proceso totalmente enzimático y sin pasos intermedios de purificación.	128
--	------------

7. CONCLUSIONES	131
------------------------	------------

8. BIBLIOGRAFÍA	133
------------------------	------------

ANEXOS	
---------------	--

ABSTRACT

In this Thesis it has been proposed to carry out the Cephalosporin C conversion to cephaloporanic semi-synthetic antibiotics in two-pot. The first pot was the 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) production from Cephalosporin C without hydrogen peroxide into the system, with two different biocatalysts where are implied three different enzymes (D-aminoacid oxidase, Catalase and Glutaryl acylase). The second pot was the 7-ACA acylation to obtain the semi-synthetic β -lactamic antibiotics; this reaction was catalyzed by Penicillim G acylase (PGA). Both processes were carried out using exclusively an enzymatic route without purification steps.

To improve the first pot reaction, it was carried out the development of several Glutaryl acylase stabilization techniques. Hence, four highly stable biocatalysts of Glutaryl acylase were designed, combining three different stabilization strategies (protein covalent immobilization, chemical modification and protein aggregation) and three different interaction ways between protein and support and between protein and protein (through epoxy and amino groups interactions, glutaraldehyde and amino groups interactions and glyoxal and amino groups interactions). All of these Glutaryl acylase derivatives achieved very high stabilization factors in comparison with the soluble preparation of this enzyme. Once it was done, it was obtained a really stable Glutaryl acylase biocatalyst, it was studied and developed a new strategy to convert the Cephalosporin C to 7-ACA in absence of hydrogen peroxide, which is able to inactivate the implied enzymes in the process. The decomposition of hydrogen peroxide was achieved co-immobilizing D-aminoacid oxidase and Catalase, yielding α -ketoadipyl 7-ACA instead Glutaryl 7-ACA, which would be yielded if the hydrogen peroxide was not eliminated by Catalase. The α -ketoadipyl 7-ACA, which was yielded from oxidative deamination of Cephalosporin C in absence of hydrogen peroxide, can be hydrolyzed by Glutaryl acylase biocatalyst. Moreover, with the aim to increase the new route efficiency, it was carried out the Glutaryl acylase improvement, using genetic engineering to increase the α -ketoadipyl 7-ACA hydrolysis rate. In this way, a double mutant of Glutaryl acylase with a K_{cat} value 6 folds higher than K_{cat} value of the wild type enzyme was got. Furthermore, when this double mutant was used in the direct conversion of Cephalosporin C to 7-ACA, the same 7-ACA production rate was achieved with 3 folds less of it than when the wild type enzyme was used.

Once, the efficiently route to produce 7-ACA from Cephalosporin C was developed, the improvement of synthetic properties of Penicillin G acylase was carried out for the selective acylation of 7-ACA nucleus through Kinetically Controlled Synthesis (KCS) and Thermodynamically Controlled Synthesis (TCS). In the case of TCS, it was development a new bi-functional support to get the directed immobilization and oriented rigidification of different PGA regions. Excellent results were achieved against organic solvents inactivation when the PGA was immobilized in a directed way on these new supports through B201 position. In this way, this derivative would be very useful in TCS, due to higher organic solvent concentration could be used, shifting the equilibrium to the synthesis, achieving higher yields.

In a different way, different parameters related with biocatalyst engineering and medium engineering were deeply studied to improve the synthetic yields of semi-synthetic β -lactamic antibiotics using KCS strategy. The immobilization system was studied, the best result about S/h1 ratio were obtained when the PGA was immobilized on agarose supports activated with glioxil groups. On the other hand, a positive effect of methanol could be observed in the KCS of semi-synthetic β -lactamic antibiotics. Moreover, with the oriented immobilization-rigidification with methanol in the process, it could be "frozen" the conformational change, which was led by methanol, and it was demonstrated that this conformational change led to improve the 7-ACA adsorption on the active site from PGA, making easy the understanding of positive effect of methanol in the KCS of semi-synthetic β -lactamic antibiotics.

At the end, all obtained improvements were applied in a two-phase system where the product, in this case semi-synthetic β -lactamic antibiotic, is in a different phase than the enzyme, avoiding in this way, the product hydrolysis, increasing the reaction final yield up to 80%.

Therefore, in this Thesis, it has been development a enzymatic route for the production of semi-synthetic β -lactamic antibiotics in two-pot system, without intermediates purification steps, with a final yield higher than 80%, using a combination of physical, chemical, genetical and egineerical strategies to develop a biocatalyst battery are able to carry out this process in an efficiency and friendly environment way.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antibióticos β -lactámicos. Una útil herramienta para luchar contra las infecciones.

La medicina de hoy en día es bastante dependiente de los antibióticos, principalmente de los antibióticos β -lactámicos. A lo largo de los años las múltiples investigaciones sobre estos compuestos han alcanzado grandes avances en la comprensión del mecanismo de acción de los mismos y han desarrollado nuevos antibióticos mucho más efectivos para la lucha contra las infecciones.

Los antibióticos β -lactámicos (Penicilinas, Cefalosporinas...) actúan sobre el centro activo de unas proteínas llamadas PBPs (*penicillin binding protein*) acilando la serina catalítica de estas, inactivando irreversiblemente su función en la síntesis del peptidoglicano bacteriano, provocando la muerte celular.(Tomasz, 1979; Giesbrecht y col 1998,). En esta tesis nos vamos a centrar en el estudio de las Cefalosporinas.

Cefalosporinas, descubrimiento, estructura y mercado.

Cefalosporina C (CFC) fue el segundo antibiótico β -lactámico descubierto después de la Penicilina G. La Cefalosporina C fue descubierta por Giuseppe Brotzu, profesor del instituto de Cagliari en la isla de Sardinia, el cual aisló un hongo del agua del mar en una zona donde desembocaban aguas residuales. El hongo aislado mostró actividad frente a bacterias gram positivas y gram negativas (Brotzu, 1948). Este hongo fue inicialmente identificado como *Cephalosporium acremonium* y más tarde reclasificado como *Acremonium chrysogenum*, para finalmente volver a reclasificarlo como *Acremonium strictum* (Onions y Brady, 1987)

La estructura química de la Cefalosporina C fue propuesta por primera vez por Abraham y Newton (1961) y confirmada por análisis de rayos-X por Hodgkin y Maslen 1961. Este compuesto consta de un anillo de dihidrotiazina de 6 miembros, a diferencia de las Penicilinas en las cuales este anillo de dihidrotiazina es de 5 miembros. En el caso de las cefalosporinas el anillo de 6 miembros está fusionado a un anillo β -lactámico, la unión de los dos anillos da como resultado un grupo llamado "Cefem". La cefalosporina C tiene unida mediante un enlace amido al C₇ una cadena lateral alifática (d-aminoadipil) y en el C₃ tiene unido un éster metílico del ácido acético. (Figura 1.1).

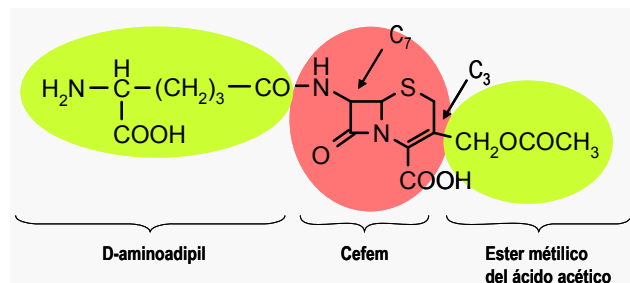


Figura 1.1. Esquema de la estructura química de la cefalosporina C:

El gran problema de la CFC es su baja estabilidad química, esto dificulta su uso en clínica médica. Por este motivo se desarrollaron una serie de modificaciones en la CFC, sobre todo modificando los grupos unidos al C_3 y C_7 del grupo "Cefem", dando lugar a las cefalosporinas semi-sintéticas. Estos nuevos derivados cefalosporánicos incrementan su actividad antibiótica frente a las bacterias y también su estabilidad a la hidrólisis ácida en el estómago lo que les permite ser administrados oralmente.

Todas las cefalosporinas, se clasifican dentro de los antibióticos β -lactámicos de amplio espectro y su uso está indicado en el tratamiento de un extenso conjunto de infecciones por gérmenes gram positivos y gram negativos. Dentro de las cefalosporinas semi-sintéticas hay cuatro grandes grupos o generaciones (Elander, 2003). La clasificación de acuerdo a las generaciones se basa fundamentalmente en su actividad antimicrobiana: las de primera generación como la Cefazolina, ejercen una adecuada actividad contra bacterias gram positivas y una actividad casi despreciable contra las gram negativas, debido a que estas bacterias hidrolizan el anillo β -lactámico al tener β -lactamasas. Las de segunda generación, como la Cefuroxima su espectro se expande a *Haemophilus influenzae* y algunas bacterias gram negativas y por último las de tercera generación como Cefotaxima y Ceftriaxona presentan alto grado de estabilidad en presencia de β -lactamasas y son generalmente menos activas contra los cocos gram positivos que los agentes de primera generación, pero son mucho más activas contra las bacterias gram negativas. Incluso en algunas clasificaciones se incluye una cuarta generación la cual es virtualmente activa frente a todas las bacterias gram negativas y positivas, un ejemplo de esta serían la Cefepima y la Cefipiroma.

Los antibióticos β -lactámicos suponen el 65% del mercado de los antibióticos, dentro de este, el mercado mundial total de cefalosporinas en el año 2000 movió alrededor de unos 10 billones \$ (Elander, 2003). Las grandes cantidades de cefalosporinas semi-sintéticas usadas en todo

el mundo, han llevado al desarrollo de un mercado muy competitivo que requiere de rutas de producción mucho más eficientes y baratas. Por otro lado, las exigencias medioambientales impuestas en los últimos años por los gobiernos para preservar la delicada salud del planeta obligan que estas rutas sean mucho más compatibles con el entorno que nos rodea. Por lo tanto el ideal reside en procesos de producción de antibióticos en condiciones suaves pero con una alta eficiencia y un coste adecuado para el valor añadido del producto.

Para la síntesis de la mayoría de la cefalosporinas semi-sintéticas se parte de un núcleo cefalosporánico, 7-ACA o 7-ADCA cuya única diferencia está en el C₃ (Figura 1.2). La combinación de estos dos núcleos con diferentes modificaciones en sus respectivos carbonos 3 y 7 permiten obtener una gama muy amplia de derivados cefalosporánicos con actividad frente a diferentes microorganismos, generando un espectro muy amplio que permite combatir a un número muy grande de agentes infecciosos.

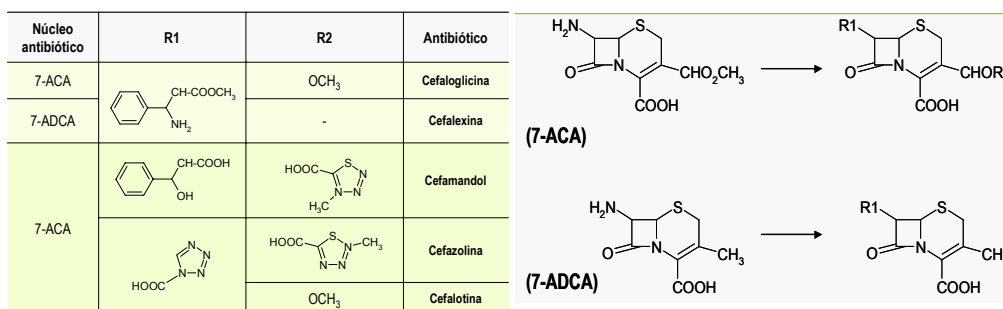


Figura 1.2. Estructura química de diferentes núcleos cefalosporánicos y diferentes antibióticos que pueden ser obtenidos desde estos núcleos.

1.2 Catalizadores biológicos implicados en procesos de producción de Cefalosporinas.

Hay multitud de enzimas capaces de actuar sobre las cefalosporinas y sus derivados (Sonawane, V.C., 2006). Sin embargo nosotros nos vamos a centrar en la hidrólisis de CFC para obtener 7-ACA, y en la modificación de este para obtener diferentes cefalosporinas semi-sintéticas. En la primera parte están implicadas principalmente dos enzimas D-aminoácido oxidasa (DAAO) y Glutaril acilasa (GAC) capaces de hidrolizar CFC a 7-ACA. En segundo lugar este 7-ACA es susceptible de ser modificado en su C7 por un enzima llamada Penicilin G acilasa (PGA), añadiendo a este carbono una cadena lateral. (Figura 1.3)

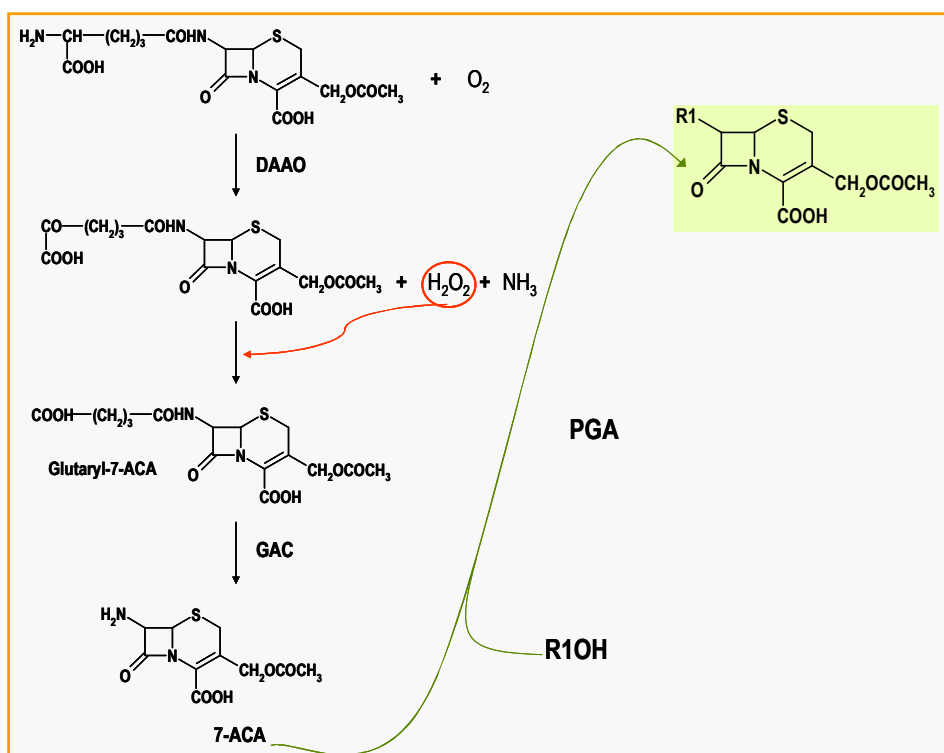
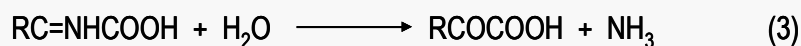
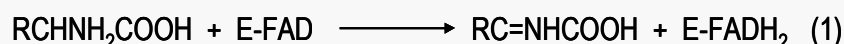


Figura 1.3. Producción de antibióticos cefalosporánicos semi-sintéticos mediante un proceso totalmente enzimático. GAC, glutaril acilasa; DAAO, D-aminoácido óxidasa; PGA, Penicilin G acilasa; R1OH, donador de acilo

1.2.1. D-aminoacido oxidasa. La enzima que modifica la CFC

Aunque durante esta tesis doctoral no se ha estudiado en profundidad esta enzima para optimizarla como biocatalizador industrial, si que es necesario comentar algunas de sus principales propiedades catalíticas por su importante papel en la producción del núcleo antibiótico base para la síntesis final de los derivados semi-sintéticos.

D-aminoacido oxidasa (DAAO)(E.C. 1.4.3.3) cataliza la oxidación de D-aminoácidos a sus correspondientes α -cetoácidos. A pesar de su amplia distribución en mamíferos y organismos eucariotas, solo se han podido obtener hasta ahora tres enzimas en preparaciones homogéneas, una de riñón de cerdo y dos de levaduras, las de *Rhodotorula gracilis* y de *Trigonopsis variabilis* (Alonso y col 1998; Pollegioni y col 2004). Las tres enzimas son homodiméricas con un peso molecular en torno a los 80 KDa conteniendo una molécula de FAD por cada subunidad unidas de forma no covalente al enzima (Pollegioni y col 2002). El mecanismo catalítico de esta enzima se puede resumir de la siguiente forma:



Durante la primera mitad de la reacción, se produce la deshidrogenación del D-aminoácido al correspondiente iminoácido acoplada a la reducción del FAD (1). El FAD se reoxida espontáneamente en presencia de oxígeno molecular, el cual se reduce a peróxido de hidrógeno (2). El iminoácido es entonces hidrolizado a α -ceto ácido y amoníaco gracias a una molécula de agua (3). La estereoespecificidad de la reacción es absoluta y restringida a los D-isómeros cuando (Mattevi y col., 1997; Pilone, 2000).

El papel de esta enzima en la síntesis de antibióticos semi-sintéticos reside en la deaminación oxidativa de la cadena lateral de la CFC. Por supuesto la conformación espacial de la CFC es D, puesto que de lo contrario esta enzima no podría actuar sobre este sustrato. Esta reacción es muy importante porque genera dos productos, uno el peróxido de hidrogeno y el otro el (7- β -5 carboxi-5-oxopentanamido)-cefalosporánico (α -cetoadipil 7-ACA). Estos dos productos son

capaces de reaccionar entre sí, de modo que el peróxido de hidrogeno produce la descarboxilación oxidativa del α -cetoadipil 7-ACA, generando agua, dióxido de carbono y glutaril 7-ACA (GL-7-ACA) (Figura 1.3)(Nikolov y Danielsson, 1994; Alfani, F., y col 1998). Esta reacción es muy importante puesto que este último producto es sustrato de otra enzima, Glutaril acilasa, capaz de hidrolizarlo a 7-ACA, nuestro núcleo de interés.

Por lo tanto la D-aminoacido oxidasa es un enzima muy importante para modificar la CFC y que otra enzima como es la Glutaril acilasa pueda producir el 7-ACA de forma eficiente.

De este modo se podría llevar a cabo la biotransformación de CFC a GL-7-ACA mediante un proceso en condiciones suaves y con muy buenos rendimientos. Además este proceso no exige la utilización de solventes clorados, aditivos tóxicos y condiciones drásticas de operación (p. ej. temperaturas tan bajas como -50°C), por lo que se logró una gran mejora en términos medioambientales (Pollegioni y col., 2002).

1.2.1. D-aminoacido oxidasa. La enzima que modifica la CFC

Glutaril acilasa (GAC) (EC 3.5.1.11) pertenece a la familia de las acilasas β -lactamas, las cuales son unas peptidasas muy especializadas capaces de romper el enlace amida que forman el anillo β -lactámico y una cadena lateral sin romper el enlace amida de este anillo. Se han propuesto muchas clasificaciones para este tipo de enzimas, pero una de las más adecuadas y representativa de la función que ejercen es la descrita por Sio y col., 2002 donde estas enzimas se dividen en dos tipos, las que son capaces de hidrolizar derivados β -lactámicos con una cadena lateral aromática y las que son capaces de hidrolizar estos mismo derivados pero con una cadena lateral alifática. Sin embargo, cabe destacar que esta manera de clasificar este tipo de enzimas no es aceptada por todos los investigadores que trabajan en este campo.

Este tipo de enzimas pertenecen a la familia de las N-terminal hidrolasas, siguiendo el mecanismo catalítico descrito para estas (Brannigan y col., 1995). El aminoácido terminal de la subunidad β del heterodímero es capaz de llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el enlace amida del sustrato. Este aminoácido terminal puede ser Ser, Thr o Cys, en el caso de GAC es Ser, siendo el grupo OH de esta Ser el que lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre el sustrato (Figura 1.4) asistido por el grupo amino terminal de este mismo aminoácido y por una molécula de agua que estabilizan el complejo acil-enzima. Este ataque conduce a la liberación de la cadena lateral, y la

enzima queda unida al núcleo antibiótico que es posteriormente liberado del centro activo por una segunda molécula de agua que recupera el estado original de la enzima (Figura 1.4).

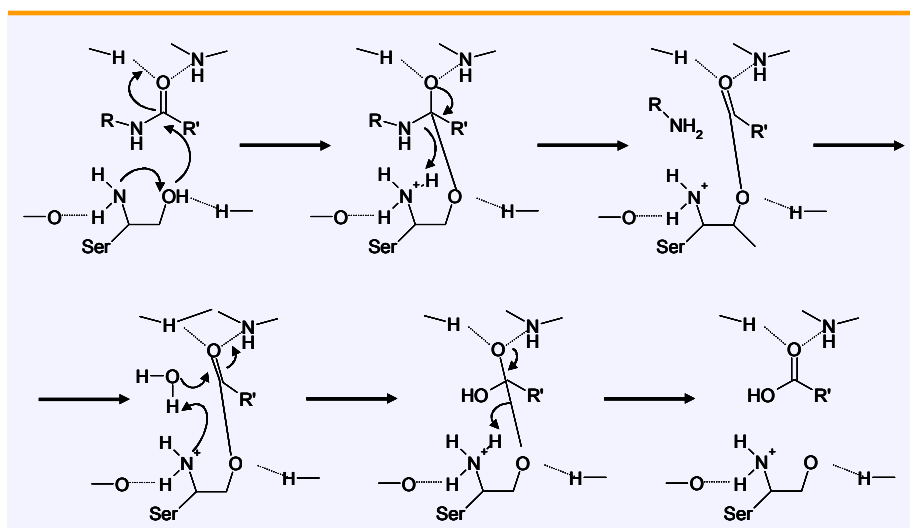


Figura 1.4. Mecanismo catalítico de GAC: El oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser 199 dona su protón al grupo amino Terminal de este aminoácido y es capaz de atacar el enlace amido del sustrato. Este estado intermedio se desprotona liberando un amino primario, resultado de la hidrólisis del sustrato. Posteriormente una molécula de agua ataca al grupo carbonilo, liberando el grupo carboxílico correspondiente y dejando el enzima en la misma conformación previa a la catálisis.

Glutaril acilasa (GAC) fue aislada por primera vez por Shibuya y col., 1981 después de una exhaustiva búsqueda para la actividad capaz de hidrolizar la cadena lateral del GL-7-ACA. Se seleccionó una cepa *Pseudomonas* SY-77 con una actividad bastante apreciable para GL-7-ACA. Posteriormente se fueron aislando otras glutaril acilasas de otras fuentes con diferentes propiedades y activas para diferentes sustratos. Según la clasificación descrita en Oh y col., 2003 basándose en las cepas aisladas por diferentes autores (Matsuda y col., 1987; Aramori y col., 1992; Li y col., 1999) existen 5 grupos de GAC en función de su afinidad a diferentes sustratos pero todas ellas con una alta actividad GL-7-ACA acilasa y con una muy baja actividad con CFC acilasa (nunca superior al 4% de la actividad manifestada con GL-7-ACA como sustrato). Cabe resaltar que los grupos I y III presentaron las mayores actividades con CFC, 4 y 2.3% respectivamente de la actividad que presentaban estas enzimas con GL-7-ACA, siendo despreciable la actividad CFC acilasa en el caso de las enzimas pertenecientes a los grupos II, IV y V.

Diferentes GAC provenientes de diferentes fuentes como *Pseudomonas SY-77* (Shibuya y col., 1981), *GK-16* (Ichikawa y col., 1981) *C247* (26, Ishii y col., 1995) *sp 130* (27, Li y col., 1998) y *Pseudomonas diminuta KAC-1* (Kim y col., 2000) son homologas con más de un 90% de identidad (Sio y col., 2002). Se han determinado las estructuras 3D mediante cristalografía de rayos-X de las formas maduras de GAC de *Pseudomonas*, *GK-16* (Kim J.K y col 2003) y de *Pseudomonas diminuta KAC-1* (Kim y col., 2001^a; Kim y col., 2001b). Estas dos estructuras son casi idénticas exceptuado la estructura del brazo espaciador.

En esta tesis doctoral vamos a trabajar con una GAC de *Pseudomonas SY-77* perteneciente a la clase I. Estas enzimas presentan un precursor de 90 kDa que requieren un procesamiento postraducional para dar lugar a dos subunidades de 16 y 54 kDa, estas subunidades son denominadas α y β respectivamente. Una vez madura el enzima es capaz de exportarse al espacio periplásmico lo que facilita su extracción (Ichikawa y col., 1981). Esta estructura forma un heterodimero muy compacto, con una disposición muy similar a la que presenta la PGA de *E.coli*. De este modo GAC y PGA presentan estructuras y mecanismos de acción muy parecidos (Fritz-Wolf y col., 2001).

Como hemos mencionado anteriormente GAC requiere de un procesamiento postraducional para generar una estructura madura y activa. Este procesamiento ha sido estudiado de forma muy intensa en este tipo de enzimas durante los últimos años, proponiendo un mecanismo para la GAC de *Pseudomonas GK-16* (Kim y col., 2003), diferente en un solo aminoácido de la GAC de *Pseudomonas SY-77*. Dicho mecanismo consta de dos pasos secuenciales con dos rupturas autoproteolíticas durante el plegamiento (Figura 1.5).

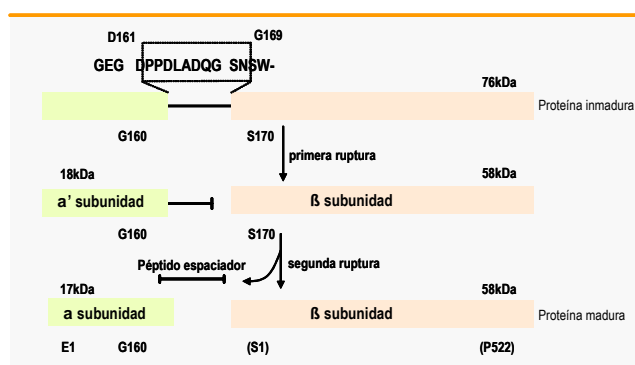


Figura 1.5. Procesamiento del precursor de GAC para generar PGA madura.

El primer paso consiste en una ruptura intramolecular del precursor enzimático entre los aminoácidos Gly 169 y Ser 170, liberando la subunidad β por lo que esta Ser 170, será la serina catalítica y el primer aminoácido de la cadena β . Por lo tanto, después de este primer paso nos quedo la subunidad α unida al péptido espaciador, cuyo tamaño varía entre 8-11 aminoácidos en función de las distintas fuentes de las que procede el enzima (Kim y col., 2003), y la subunidad β libre. El segundo paso es una ruptura intermolecular del péptido espaciador y la subunidad α entre la Gly 160y el Asp 161 llevado a cabo por la Ser 170 de la subunidad β , plegándose ambas subunidades generando un hetero dimerio activo $\alpha\beta$ (Kim y col., 2000) o en un heterotetramero activo $\alpha\beta\beta\alpha$ (Kim y col., 2003; Fritz-Wolf y col., 2001; Kim y col., 2006). En este segundo paso de autoproteolisis el aminoácido Glu 159 del péptido espaciador se reveló como crucial en el mecanismo de este proceso, bien porque su cadena lateral sea muy importante para acomodar la subunidad α unida al peptido separador cerca de la Ser 170 para llevar a cabo una segunda ruptura intermolecular (Kim y Kim, 2001a) o bien porque este aminoácido actué como residuo catalítico (Kim y col., 2006) de este modo tendríamos dos procesos autocatalíticos intramoleculares por dos mecanismos diferentes, el primero a través de la Ser 170 y el segundo a través de el Glu 159.

Además la determinación de las estructuras 3D de los complejos enzima-sustrato y enzima-glutarato (cadena lateral del GL-7-ACA) (Kim y Hol, 2001b) permitió comprender y estudiar mucho mejor los residuos implicados en la interacción enzima sustrato. En primer lugar se observo que los residuos Ser 170 β (serina catalítica), His β 23 y Gln β 455 son los que llevan a cabo la catálisis, sin embargo se han propuesto dos mecanismos catalíticos el de la triada catalítica clásica (Kim col., 2003) o mediante un par catalítico Ser 1 β / His β 23/ His β 23/ Gln β 455 (Fritz-Wolf y col., 2001).

En cuanto a la interacción enzima-sustrato se ha descrito que el núcleo antibiótico no es muy importante para el reconocimiento del sustrato, o lo que es lo mismo que la interacción entre el núcleo antibiótico y el centro activo no es específica (Kim y Hol, 2001b). Sin embargo la posición de la cadena alifática del glutaril 7-ACA en el centro activo determina que la hidrólisis del enlace amido se lleve de forma eficiente. Hay varios residuos implicados, entre los más importantes están Arg β 57, Tyr α 149 y Tyr β 33 que fueron determinados de la resolución de la estructura 3D de GAC de *Pseudomonas diminuta* KAC-1 (Kim y Hol, 2001b). Principalmente Arg β 57 fue clave en formación del complejo enzima sustrato puesta que el grupo amino de su cadena lateral es capaz de establecer

puentes de hidrogeno con el grupo carboxilo del sustrato. Además se ha descrito que esta enzima es capaz de sufrir un cambio conformacional del centro aditivo inducido por el sustrato durante el curso de la catálisis (Huang y col., 2002), similar a lo que ocurre con PGA cuando interacciona con sustratos aromáticos (Done, S.H., y col 1998). El residuo más importante en este cambio conformacional es el Trp- β 4, que cambia su posición para dejar accesible la serina catalítica al sustrato (Huang, X., 2002).

De este modo, llevando estudios racionales de los residuos implicados en el reconociendo del sustrato se podrían lograr mutantes de GAC capaces de hidrolizar sustratos de interés industrial.

Uno de ellos es sería la CFC puesto que la hidrólisis enzimática directa de esta nos evitaría el paso enzimático llevado a cabo por la DAAO, produciendo 7-ACA en un solo paso. No se ha conseguido encontrar un enzima nativo capaz de hidrolizar CFC con una velocidad adecuada para su uso industrial (Matsuda, A. y col., 1987; Reyes y col., 1990).

Por este motivo se han puesto notables esfuerzos en conseguir mutantes de las diferentes GAC descritas. Varios grupos han trabajado intensamente en mejorar GAC para el reconocimiento de otros sustratos con cadenas alifáticas mayores a la del GL-7-ACA.

De este modo se han conseguido mutantes de GAC de *Pseudomonas SY-77* mediante la combinación de novedosas técnicas de evolución dirigida y mutagénesis racional que mejoran la actividad con adipil-7-ADCA, sustrato con un átomo de carbono más en su cadena lateral que el GL-7-ACA, proveniente de la fermentación de *Penicillium chrysogenum* en presencia de ácido adípico (Crawford y col., 1995). La hidrólisis de este sustrato es interesante puesto que uno de los productos es 7-ADCA importante intermediario de la síntesis de antibióticos. De los mejores mutantes obtenidos, se han identificado tres posiciones críticas a la hora de alojar una cadena lateral de mayor tamaño en el bolsillo de unión del sustrato, estos son Tyr 178 (Sio y col., 2002) Asn 266 y Phe 375 (Otten y col., 2002).

Por otro lado, mediante diseño racional de mutaciones y combinaciones de estas se consiguieron mutantes de GAC con una actividad CFC acilasa 8 veces mejor que el enzima nativa, siendo esta actividad el 16% de la actividad que la enzima nativa tiene con GL-7-ACA (Oh y col., 2003), un resultado parecido se consiguió mediante evolución dirigida de un gen de glutaril acilasa de *Pseudomonas N176* donde se le ha cambiado la secuencia nucleotídica para adaptarla al código de codones de *E.coli* (Pollegioni y col., 2005).

Por lo tanto GAC es una enzima muy específica para sustratos con cadenas alifáticas de una longitud determinada, esto la hace un muy buen catalizador para la hidrólisis industrial del GL-7-ACA. Además es capaz de hidrolizar enantioselectivamente amidas (Raimondi y col., 2003a; Raimondi y col 2003b) y ésteres (Raimondi y col., 2003b; Adani y col 2005). Pero la versatilidad de este biocatalizador no acaba aquí, porque es capaz de llevar a cabo la síntesis de amidas partiendo diferentes aminas y con el ácido glutárico ó ésteres del mismo (Biffi y col., 2002).

1.2.3 Penicilina G acilasa, la enzima que sintetiza.

Penicilina G acilasa (PGA) (EC. 3.5.1.11) se encuentra en la naturaleza en gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, levaduras, hongos) (Sudhakaran y col 1992; Verhaert y col 1997; Parmar y col., 2000). Es una de las enzimas más importantes en la biocatálisis, tanto por su uso industrial como por la cantidad de estudios académicos en los que se ha utilizado. Su actividad por excelencia es la hidrólisis de Penicilina G para formar 6-APA (importante precursor en la síntesis de antibióticos semi-sintéticos). Este proceso fue uno de los primeros en ser catalizados por un enzima (Alkema y col., 2006; Parmar y col., 2000). La PGA usada industrialmente y más estudiada es la proveniente de *E.coli*, (Trasvascio y col., 2002). Su función natural no está muy definida, existiendo muchas dudas sobre el papel que juega en el metabolismo bacteriano, se ha sugerido que puede participar en la hidrólisis de compuestos fenilacetilados para generar ácido fenilacético, el cual sería usado como fuente de carbono (Valle y col, 1991; Duggleby y col, 1995; Prieto y col, 1996; Done y col, 1998; Arroyo y col, 2003)

Al igual que GAC, PGA pertenece a la familia de las N-terminal hidrolasas, con un mecanismo muy similar al descrito en el punto 1.2.2 para GAC. Además esta enzima está sujeta a un procesamiento postraducional necesario para generar una enzima madura y activa con un amino terminal reactivo, al igual que la GAC la primera serina de la subunidad β (Duggleby y col., 1995). El mecanismo de procesamiento es muy similar al descrito para la GAC (Figura 1.5), con un péptido señal y un péptido espaciador, con dos sitios de corte en los residuos Ala 209 y Ser 264 (Choi y col., 1992; Duggleby y col., 1995; Hewitt y col., 2000) generando un heterodímero formado por dos subunidades, α de 25 KDa y otra β de 61 KDa, por lo que el enzima madura tiene un peso molecular de 86 KDa frente a los 70 que presentaba la GAC. Es conocido que la secuencia señal permite la

exportación de esta enzima al espacio periplásmico mediante un sistema TAT facilitando su producción (Ignatova y col., 2000).

La estructura 3D fue resuelta por cristalografía de rayos-X, además se han resultado múltiples complejos enzima-sustratos, lo que nos ha ayudado a conocer como es la disposición de la enzima durante la catálisis. Se sabe que esta enzima tiene una estructura piramidal con una profunda depresión central al fondo de la cual se encuentra el centro activo con la serina catalítica (Hunt y col, 1990; Duggleby y col, 1995). El bolsillo de unión al sustrato esta formado principalmente por residuos hidrofóbicos de ambas subunidades, lo cual define la alta especificad de esta enzima por los sustratos aromáticos (Alkema y col. 2002 a)

A través de varios estudios de modificación química, mutagénesis dirigida y de interpretación de la estructura 3D se han podido determinar varios residuos aminoácidos muy importantes tanto para la catálisis como para la fijación del sustrato en el centro activo (Tabla 1.1).

Nucleófilo	Cerca del nucleófilo	Cerca del Na	Hueco oxianiónico	Unión al sustrato	Coordinación del ión de calcio
Ser B1	GlnB23	AsB241 GlnB23	AlaB69 AsnB241 GlnB23	PheB24 PheB57 SerB67 ArgA145 ArgB263	PheB71 AspB73 ValB75 AspB76 PheA146

Tabla1.1- Residuos de aminoácidos importantes para la catálisis de la PGA. Adaptado de Oinonen, y co.l, 2000; McVey y col., 2001; . Alkema y col., 2002b

La especificad de la PGA por su sustrato es un poco compleja, (Figura 1.6). Por un lado, el subsitio de unión del grupo acilo es muy específico por el ácido fenilacético, sol pequeños grupos, como son hidroxilo (ácido mandélico) o aminos (fenilglicina), están permitidos como sustituyentes en la posición α de este ácido.

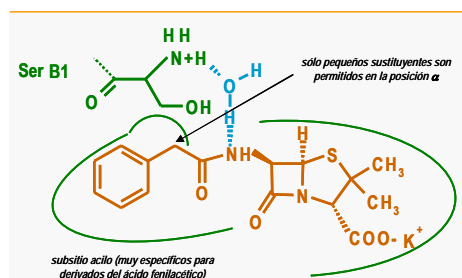


Figura 1.6. Especificidad de sustrato de la PGA.

Por otro lado, el subsitio donde se aloja el nitrógeno del enlace amida hace que sea muy específico para el isomero L, por lo que puede discriminar entre diferentes aminas primarias quirales (Basso y col., 2002; Calleri y col., 2004). Esto hace que la PGA sea un catalizador muy interesante más allá de su actividad amidásica. Esta enzima puede usarse en reacciones de gran interés en síntesis orgánica, como la resolución de mezclas racémicas de alcoholes, ésteres y aminas mediante reacciones enantioselectivas de hidrólisis y síntesis. (Elbert y col., 1996; Roche y col., 1999; Rocchietti y col., 2002), la acilación inespecífica de nucleófilos (Rossell y col, 1993; Basso y col, 2002), la protección de grupos en síntesis de péptidos (Fité y col, 1997; Didziapetris y col, 1991). Sin embargo la actividad más interesante para nosotros y clave en el desarrollo de esta tesis doctoral es la síntesis de antibióticos semi-semisintéticos mediante la acilación de núcleos antibióticos con diferentes ésteres ó ácidos (Brudink, 2001; Wegman y col, 2001; Arroyo y col, 2003).

1.3 Estilización enzimática. Una herramienta necesaria para el uso de enzimas como biocatalizadores industriales.

Las enzimas presentan una serie de propiedades que les diferencian del resto de los catalizadores. Entre estas hemos de destacar la alta eficacia catalítica, la alta especificidad por el sustrato, biodegradabilidad y su alta actividad en condiciones suaves de reacción (presión y temperatura ambiente, pH neutros) (Treva, 1980; Dziezak, 1991). De todas estas propiedades la especificidad es sin duda la más valorada para los procesos de producción de fármacos y en reacciones de química fina (Bommarus y Polizzi, 2006). Sin embargo hoy en día esta incrementando el interés científico en la búsqueda de enzimas que sean capaces de llevar a cabo reacciones diferentes de las reacciones para las que han sido diseñadas por la naturaleza (Bornscheuer y Kazlauskas, 2004). De este modo están apareciendo nuevas reacciones catalizadas por enzimas que han sido normalmente

empleadas para reacciones muy distintas, incluso opuestas (p.e se pueden usar hidrolasas como sintetasas)(Bornscheuer y Kazlauskas, 2004).

Sin embargo estas excelentes propiedades se ven difuminadas por los problemas que presentan las enzimas cuando queremos usarlas a nivel industrial. Principalmente nos encontramos con dos problemas. (Faber, 1996).

1) Su baja estabilidad en condiciones de reacción, esto dificulta su almacenamiento y hace que sean inútiles después de pocos ciclos de reacción (Zaks, 2001; Ò'Fágáin, 2003; Illanes y Wilson, 2003). Además esta inactivación es irreversible, previo paso por un estado de desnaturalización reversible, que desemboca en una conformación que es incapaz de recuperar la conformación original perdiendo la actividad (Mozhaev, 1993).

2) Su solubilidad, lo que dificulta en primer lugar su separación del medio de reacción y en segundo su re-utilización en posteriores ciclos de reacción.

Para solucionar estos dos problemas se han desarrollado diferentes metodologías para estabilizar las enzimas en preparaciones insolubles. Entre las múltiples estrategias para lograr este objetivo están; las inmovilización de proteínas a soportes sólidos, esta puede ser reversible o irreversible, el entrecruzamiento de proteínas agregadas o el confinamiento en diferentes polímeros o sistemas de confinamiento (Trevan, 1980; Illanes, 1994; Faber, 1996, Fernández-Lafuente y Guisán, 1998). (Figura 1.7)

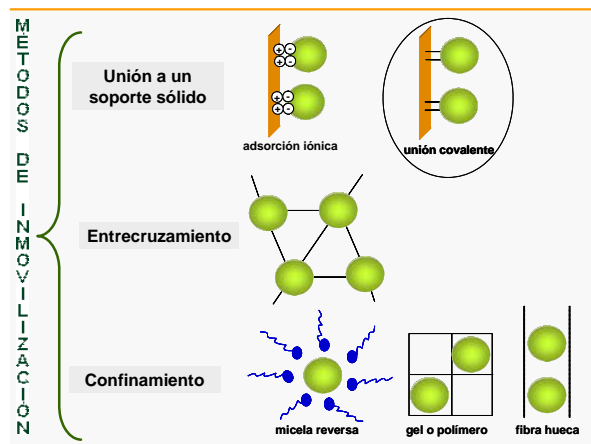


Figura 1.7. Diferentes métodos de inmovilización.

1.3.1 Métodos sencillos y eficientes de inmovilización de enzimas en soportes porosos.

La inmovilización por el mero de hecho de unir a las proteínas a soportes sólidos nos permite tener biocatalizadores insolubles fácilmente separables de la mezcla de reacción (Figura 1.10). Sin embargo inmovilización no implica estabilización, por lo tanto es muy importante la selección del sistema de inmovilización adecuado para lograr una estabilización de la estructura terciaria de la proteína y evitar su desnaturalización que nos llevaría a la inactivación enzimática (Mozhaev, 1993).

La inmovilización de proteínas puede ser reversible o irreversible, en la primera la enzima puede ser desorbida del soporte recuperando el soporte una vez se haya inactivado la enzima (Gupta, 1991), por el contrario en la segunda la enzima esta unida de forma irreversible por lo que cuando la enzima este inactiva, se ha de eliminar todo el biocatalizador, enzima y soporte (Gupta, 1991). Sin embargo con la inmovilización reversible no se pueden alcanzar grandes factores de estabilización debido a que no son capaces de rigidificar la estructura terciaria, salvo para el caso de enzimas multiméricas en las que se puede evitar la disociación de subunidades, porque estos sistemas si que son capaces de estabilizar la estructura cuaternaria (Torres y col, 2002; Torres y col 2004).

Solamente la inmovilización covalente multipuntual promueve una rigidificación de la estructura terciaria del enzima, lo que se puede traducir en una estabilización de la enzima (Martinek y col, 1977; Klibanov, 1982; Gianfreda y Scarfi, 1991; Gupta, 1991;). Un sistema adecuado de inmovilización requiere una serie de características para facilitar la unión covalente multipuntual (UCM) entre el enzima y el soporte. Estas características hacen referencia a la naturaleza del soporte, a los grupos reactivos del mismo y a las condiciones de inmovilización (Fernandez-Lafuente y Guisan, 1998, Mateo 2000 epoxidos).

-Soporte: Debe tener una superficie interna muy grande para poder albergar una gran cantidad de proteína y además debe tener una gran densidad de grupos reactivos para posibilitar una UCM muy intensa. Además el soporte debería favorecer una buena congruencia geométrica entre su superficie y la de la enzima a inmovilizar. La naturaleza del soporte es una propiedad que afecta directamente a la estabilidad enzimática, hay enzimas que alcanzan altas estabilizaciones al ser inmovilizadas en soportes muy hidrofóbicos (Palomo y col., 2002; Palomo y col., 2004) y otras las cuales las

superficies muy hidrofóbicas tienen un efecto muy negativo en su estabilidad. (López-Gallego y col., 2005)

-Grupos reactivos: Deben ser muy reactivos con algunos de los residuos de la superficie de la enzima, no deben tener problemas estéricos para interactuar con la enzima y deben presentar una alta estabilidad tanto en las condiciones de inmovilización como en las de almacenamiento.

-Condiciones de inmovilización: Deben favorecer la reactividad entre el enzima y el soporte y sería ideal que en estas condiciones el enzima preservara su actividad.

Uno de los soportes que mejor cumple todos estos requerimientos es el Glioxil-agarosa (Guisan, 1988), este soporte ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo, y con el se han conseguido estabilizar multitud de enzimas muy interesantes industrialmente (Mateo y col 2005; Kuroiwa y col 2005; Mateo y col., 2006). Sin embargo presenta dos problemas; tanto las condiciones de inmovilización (pH muy básicos) como el paso a la reducción posterior a la inmovilización para hacer irreversibles los enlaces entre el enzima y el soporte (Blanco y Guisan, 1989), suponen el gran cuello de botella de este soporte debido a que muchas enzimas pierden su actividad en estas condiciones de inmovilización y además la implantación a nivel industrial del proceso de reducción es un tanto complicada debido a la naturaleza explosiva del borohidruro (agente reductor)

Además, este sistema estrictamente inmoviliza a través de los grupos α -amino de las lisinas superficiales. Aunque estos residuos son muy abundantes en la superficie de la mayoría de las enzimas, algunas enzimas presentan muy pocos de estos residuos en su superficie, imposibilitando su estabilización en este tipo de soportes.

En este trabajo se han usado diferentes estrategias de inmovilización tanto covalente como reversible a través de diferentes químicas de unión entre el enzima y el soporte. (Tabla 1.2).

Soporte	Grupos reactivos	Grupos reactivos de la enzima involucrados en la unión con el soporte	Tipo de unión al soporte
Agarosa activada con bromocianogeno	Imido carbonato	Amino terminal y aminos de bajo pKa	Covalente
Agarosa activada con glioxil	Aldehído alifáticos	Aminos de las lisinas	Covalente
Soportes activados con glutaraldehído	Aldehídos cíclicos	Aminos terminal y aminos de bajo pKa	Covalente
Soportes activados con grupos aminos primarios (Sepabeads-EA)	Grupos amino primarios alifáticos	Aspárticos y glutámicos cargados negativamente	Iónica
Soportes activados con grupos epóxido (EC-EP)	Grupos epóxido	1) etapa de adsorción: A través de la zona más hidrofóbica. 2) Aminos de las Lys, hidroxilos de Tyr, Ser y SH de las cisteínas	1) adsorción hidrofóbica 2) covalente
Soportes activados con grupos epóxido y grupos amino (Sepabeads EC-HFA).	Grupos epóxido y grupos amino secundarios cargados positivamente	1) etapa de adsorción: A través de la zona más rica en cargas negativas. 2) Aminos de las Lys, hidroxilos de Tyr, Ser y SH de las cisteínas	1) adsorción iónica 2) covalente

Tabla 2.1. Diferentes metodologías de inmovilización en diferentes soportes y a través de diferentes químicas

1.3.1.1 Inmovilización covalente multipuntual a través de la química del glutaraldehído.

El glutaraldehído es un agente muy versátil y reactivo para inmovilizar enzimas de forma covalente, estas pueden ser inmovilizadas en soportes preactivados con glutaraldehído (Burteau y col., 1989; Lamas y col., 2001; Zhou y Che, 2001; Barros Rui y col., 2003; Dos Reis-Costa y col., 2003; Magnan y col., 2004; Tukul y Alptekin, 2004), o bien se pueden entrecruzar con glutaraldehído las enzimas previamente absorbidas a soportes con aminos primarios (D'Souza y Kubal, 2002; Hwang y col., 2004). En ambos protocolos la enzima primero se absorbe ionicamente y posteriormente reacciona con el glutaraldehído quedando inmovilizada covalentemente al soporte (Balcao y col., 2001; Mieglo y col., 2003). Sin embargo hay una diferencia importante entre estas dos estrategias, la modificación química del enzima usando soportes preactivados es mucho menor que cuando el enzima previamente inmovilizada es tratada con glutaraldehído (Fernandez-Lafuente y col., 1995). (Figura 1.8)

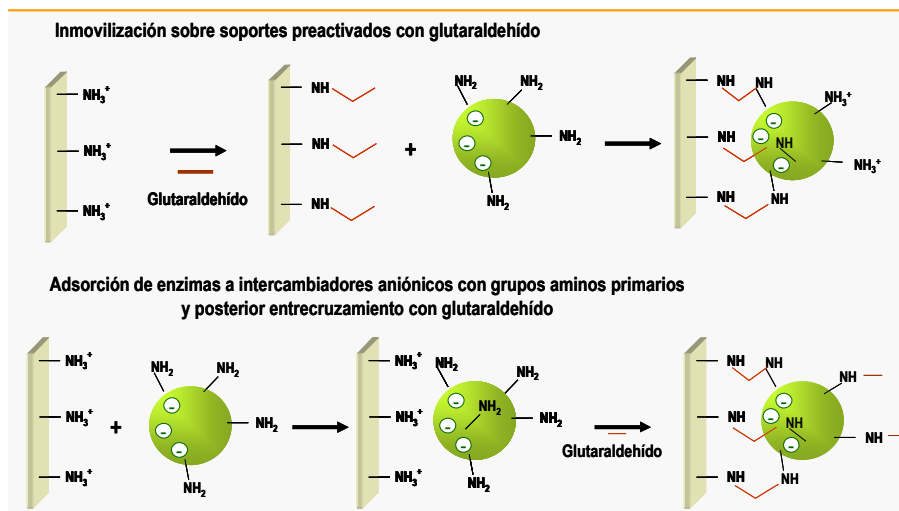


Figura 1.8. Estrategias de inmovilización covalente multipuntual a través de la química del glutaraldehído.

La estructura resultante de la reacción entre el glutaraldehído y los grupos amino está todavía bajo discusión (Mosan, 1978; Migneault y col., 2004). Sin embargo controlando las condiciones de activación de los soportes se pueden tener soportes con una o con dos moléculas de glutaraldehído por grupo amino. Esto es importante puesto que estos soportes tienen diferentes propiedades a la hora de inmovilizar y estabilizar proteínas (Betancor y co., 2006).

Por otro lado, el pH usado para llevar a cabo la inmovilización en soportes preactivados es de entre 7-8.5 debido a la baja estabilidad del glutaraldehído a valores altos de pH. En estas condiciones de inmovilización los grupos α -amino de las lisinas son muy poco reactivos, dificultando una interacción muy intensa entre la enzima y el soporte. Por el contrario, cuando la enzima primero se absorbe a un soporte con aminos primarios, generalmente mediante un mecanismo de intercambio aniónico, y es tratado con glutaraldehído en condiciones suaves de reacción todos los grupos amino del enzima y del soporte son modificados con una molécula de glutaraldehído. Esto puede favorecer la reactividad entre dos moléculas de glutaraldehído, una del soporte otra del enzima, bajo un rango más amplio de condiciones de reacción (Fernández-Lafuente y col., 1995). De esta manera, los grupos α -amino de las lisinas de la enzima quedarán unidos covalentemente a los grupos amino primario del soporte a través de dos moléculas de glutaraldehído estableciendo una unión covalente multipuntual entre la enzima y el soporte.

1.3.1.2 Inmovilización covalente sobre soportes epoxi-acrílicos.

El mecanismo de inmovilización en soportes epoxi-acrílicos es mediante dos etapas, una primera adsorción hidrofóbica rápida favorecida por la alta fuerza iónica del medio de inmovilización y la naturaleza hidrofóbica del soporte y una posterior reacción covalente más lenta entre el enzima y los epóxidos del soporte (Wheatley y Schmindt, 1999) (Figura 1.9).

Mediante esta estrategia el enzima se inmovilizará por las zonas más hidrofóbicas de su superficie debido a ese primer paso de absorción hidrofóbica. Sin embargo aunque la enzima puede reaccionar covalentemente con el soporte, las condiciones de inmovilización no favorecen una UCM muy intensa debido a la baja reactividad de los grupos del enzima con los del soporte en estas condiciones. Por ejemplo, las lisnas (residuos nucleófilos mayoritarios de la superficie proteica) tienen un pK cercano a 10.5, por lo que son muy poco reactivos en las condiciones de inmovilización (Hartmeier, 1998). Recientemente se desarrollado una estrategia (Mateo y col., 2000a) muy sencilla que permite la estabilización de enzimas mediante UCM en soportes epóxido. Esto fue posible al incrementar la reactividad de los grupos amino de la superficie proteica, mediante la incubación de la enzima previamente inmovilizada durante largos períodos de tiempo a pH alcalino, (pH 10) para favorecer la reactividad de los nucleófilos de la superficie enzimática

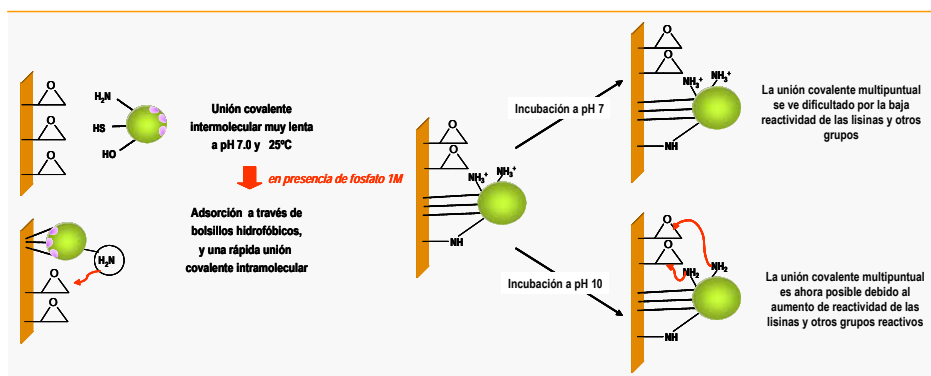


Figura 1.9. Mecanismo de inmovilización y rigidificación de proteínas en soportes hidrofóbicos con grupos epóxidos

1.3.1.3 Inmovilización en soportes epóxido heterofuncionales. Muchos caminos de inmovilización bajo una misma idea.

Los soportes heterofuncionales son la evolución de los soportes epoxi-acrílicos clásicos. Consisten en soportes con dos ó más grupos reactivos diferentes, de ahí su naturaleza heterofuncional. Estos soportes fueron diseñados principalmente para poder inmovilizar proteínas en soportes epoxy-acrílicos sin necesidad de usar alta fuerza iónica.

De este modo, en base al mecanismo en dos etapas comentado anteriormente para la inmovilización sobre soportes epoxi-acrílicos, se diseñaron unos nuevos soportes donde los grupos epóxidos han sido parcialmente modificados con diferentes grupos funcionales, como aminos primarios, quelatos metálicos, grupos boronatos etc., (Mateo y col., 2000c, Mateo y col 2003; Torres y col, 2005). Con este tipo de soportes conseguiríamos cambiar el mecanismo de inmovilización, puesto que ahora la primera etapa la adsorción física del enzima al soporte irá por otro tipo de interacciones que no requieran la presencia de altas concentraciones de sal (p.e iónicas si el soporte tiene grupos cargados, tipo coordinación si el soporte tiene grupos quelatos metálicos, incluso a través de zonas glicosiladas si el soporte tiene grupos boronatos). Aunque la segunda etapa sigue siendo igual que en el caso de los soportes epoxi-acrílicos tradicionales, puesto que los grupos reactivos del enzima y del soporte están muy cerca también están muy cerca.

Es en esta primera etapa donde reside la principal ventaja de estos soportes, no solo porque ya no necesitamos altas concentraciones de sal en la inmovilización que podría ser deletérea para la enzima soluble sino porque nos permite una orientación parcialmente dirigida. Esto quiere decir, que las enzimas se orientaran por las zonas capaces que tengan mayor número de residuos a través de los cuales la enzima se adsorbe al soporte en la primera etapa. Por ejemplo, si tenemos un soporte heterofuncional con grupos epóxido y aminos, la enzima se absorberá al soporte por las zonas más ricas en carga negativa, si tenemos grupos quelatos metálicos a través de la zona con más histidinas, si es con grupos boronato a través de la zona más glicosilada, si es con grupos SH a través de la zona más rica en Cys..... (Figura 1.10). Con este tipo de estrategias se han conseguido estabilizar muchas enzimas con un alto interés industrial (Mateo y col., 2003; Pessela y col., 2003; Gazu y col., 2005; Palomo y col 2005; Torres y col., 2005)

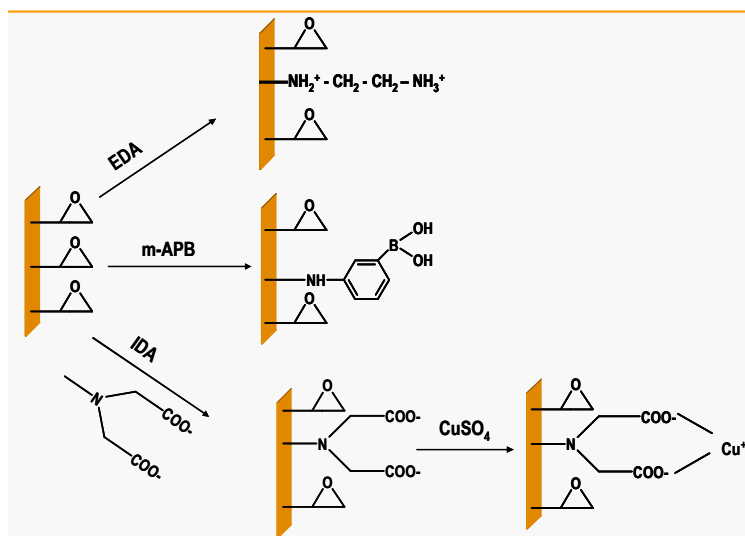


Figura 1.10. Síntesis de soportes epóxido heterobifuncionales por derivatización parcial con: etilendiamina (EDA), ácido fenilborónico (m-APB) y ácido iminodiacético (IDA).

Esta estrategia fue precursora de una nueva generación de soportes heterofuncionales los cuales tienen el mismo número de ambos grupos funcionales. Solucionando el gran inconveniente que presentaron los primeros soportes heterofuncionales, puesto que se debía controlar muy bien la cantidad de ambos grupos funcionales para alcanzar un compromiso entre una buena velocidad de inmovilización en la primera etapa y una alta UCM en la segunda (Mateo y col 2000c).

Esta nueva estrategia desembocó en el desarrollo de un soporte comercial, el **Sepabeads EC-HFA**, el cual tiene tantos grupos epóxido como una resina epoxi-acrílica normal y además tiene los mismos grupos aminos cargados positivamente (Figura 1.11). En este soporte las enzimas se absorben rápidamente en condiciones suaves de reacción (pH 7, 25°C baja fuerza iónica) mediante un mecanismo iónico a través de las zonas más ricas en cargas negativas y posteriormente pueden ser inmovilizadas covalentemente debido a la reacción entre los grupos epóxido del soporte y los α -amino de las Lys superficiales de la enzima (Mateo y col 2003). Esta unión covalente además puede ser mejorada incubando el derivado inmovilizado a pH alcalino para favorecer la reactividad entre las lisinas y los epóxidos.

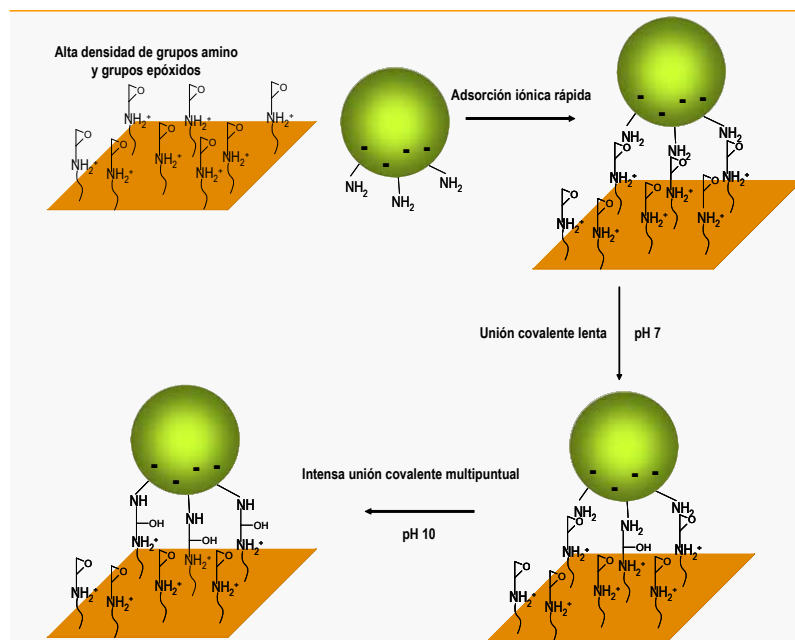


Figura 1.11. Mecanismos de inmovilización de enzimas en soportes heterofuncionales de última generación (Sepabeads EC-HFA)

1.3.1.4 Inmovilización dirigida y rigidificación orientada de proteínas.

Hasta ahora, solo se ha hablado de técnicas que nos sugieren, pero no garantizan, la zona exacta por la que se inmoviliza la enzima. Sin embargo, el desarrollo de técnicas que nos permitan asegurarnos de que una enzima se inmoviliza en el soporte por una zona determinada y solo por esa una es de gran interés tanto a nivel académico como a nivel industrial (Sundberg y col., 1995; Luk y col., 2004). Con este tipo de técnicas se podría identificar zonas importantes para la estabilización enzimática y estabilizar las zonas ya propuestas como decisivas para la estabilidad por otro tipo de análisis. Se ha planteado la teoría de que el proceso de desnaturalización proteica comienza en una o determinadas regiones de su superficie, por lo que el efecto estabilizador de la inmovilización es mucho más eficiente si estos “núcleos de desplegamiento” son fijados al soporte (Figura 1.12). Se ha descrito recientemente la estabilización de proteínas inmovilizadas al soporte a

través de la zona donde se habían propuesto núcleos de “desplegamineto” (Mansfeld y col., 1999; Mansfeld y col., 2000).

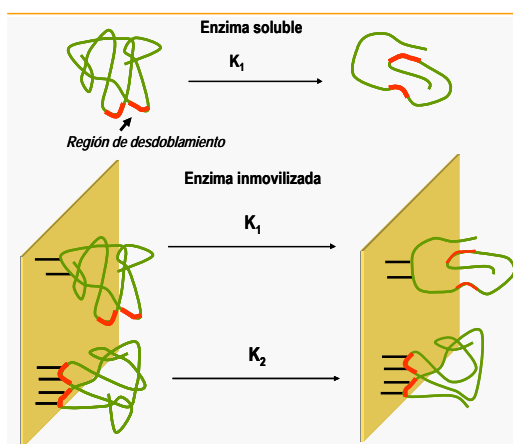


Figura 1.12. **Modelo de la “región de desdoblamiento”**. El desdoblamiento de la molécula de enzima soluble se inicia en el sitio más lábil de la misma, los núcleos de desdoblamiento. K_1 es la constante de desdoblamiento de la enzima soluble y K_2 es la constante de desdoblamiento modificada por la inmovilización.

Por otro lado es conocido que algunas enzimas pueden sufrir cambios conformacionales conocidos en la estructura terciaria de una determinada zona provocados por determinados sustratos o determinadas condiciones del medio (Alkema y col., 2002b; Huang y col., 2002; Ulijn R.V y col 2002) . Con las técnicas de inmovilización dirigida y rigidificación orientada podríamos “congelar” estos cambios y ver que ocurre al enzima en condiciones donde no este el agente responsable del cambio (Figura 1.12).

Se ha desarrollado una potente técnica para la rigidificación orientada de proteínas por cualquier zona de su superficie combinando dos campos tan dispares como la inmovilización enzimática y la ingeniería genética. Esta técnica esta basada en la preparación de soportes heterofuncionales con grupos epóxido y tioles con un mecanismo en dos etapas, una inmovilización covalente reversible mediante un intercambio tiol-disulfuro entre los SH de la proteína y los SH del soporte y una rigidificación covalente irreversible a pH alcalino mediante la reacción de los amino de la lisinas superficiales del enzima y los epóxidos del soporte (Grazu y col 2005). De este modo la inmovilización ocurrirá por las zonas proteicas con grupos SH (Cys). Este sistema presenta numerosas ventajas, por un lado los grupos sulfhidrilo son los nucleófilos más reactivos presentes en las superficies proteicas y el intercambio tiol-disulfuro es muy selectivo (Carlsson y col., 1975; Batista-Viera y col., 1994; Batista-Viera y col., 1996). Además, las cisteínas son mucho menos

abundantes en las superficies proteicas que otros aminoácidos como lisinas (Hermanson, 1996), por lo que el número de zonas susceptibles de inmovilización es mucho más pequeño, además si la enzima no tuviera cisteínas se podrían introducir mediante mutagénesis dirigida en cualquier zona que nos propusiéramos (Masfeld y col, 1999; Mansfeld, y col 2000), posibilitando la inmovilización de una misma proteína por varias zonas. Sin embargo el problema de estos soportes reside en la etapa de rigidificación a pH alcalino, puesto que estos han sido desarrollados sobre Eupergit C, un soporte donde la congruencia geométrica con el enzima es mucho más baja que en el caso de la agarosa, alcanzándose grados de rigidificación más bajos (Grazu, 2006).

La alternativa a estos soportes para conseguir mayores grados de rigidificación sería la síntesis de un soporte bifuncional (glioxil-SH) sobre agarosa. En este caso se aprovecharían la mejor congruencia geométrica de la agarosa y las excelentes propiedades de los grupos glioxil para establecer una unión covalente multipuntual muy intensa con el enzima (Guisan, 1988).

Con estos nuevos soportes se podrá llevar a cabo la rigidificación orientada de enzimas logrando altos grados de interacción entre el enzima y el soporte que permitirían fijar mejor los cambios conformacionales del enzima inducidos en determinadas condiciones que el soporte bifuncional sobre Eupergit C. De este modo se puede analizar el efecto del cambio conformacional en las propiedades enzimáticas en condiciones muy distintas a las que indujeron dicho cambio. Por lo tanto podríamos tener conformaciones de la enzima que nunca podrían darse de forma natural (Figura 1.13)

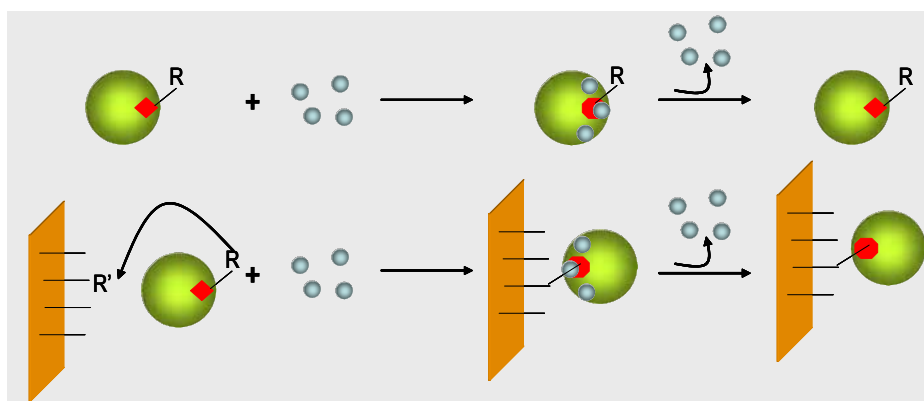


Figura 1.13. Congelación de cambios conformacionales mediante la inmovilización-rigidificación orientada.

1.3.2 Modificación química de proteínas.

La modificación química de proteínas se ha presentado a lo largo de los años como una excelente estrategia para la estabilización de proteínas, aunque en los últimos tiempos la ingeniería genética le esta quitando protagonismo (O'Fagain, 2003). Sin embargo ambas estrategias se pueden usar de manera complementaria, de hecho el efecto de la una puede ayudar a la otra. Es decir, se puede usar la modificación química como una primera aproximación para estudiar el efecto de los nuevos grupos introducidos en las propiedades de las proteínas. Conocidos los resultados de la modificación química se puede diseñar una estrategia para meter introducir por modificación genética los mismos grupos que se introdujeron por modificación química.

La modificación química presenta algunas ventajas con respecto a la modificación genética; (i) la enzima se modifica ya plegada, por lo que podemos modificar aminoácidos importantes para el plegamiento de la misma sin afectar a este. Además (ii) los nuevos grupos introducidos pueden ser bastantes diferentes a los grupos que nos ofrecen las cadenas laterales de los 20 aminoácidos e incluso mucho más reactivos que estos. Sin embargo la principal desventaja con respecto a la modificación genética es que en la primera cada vez que se produzca el enzima debe ser modificada, por el contrario con la segunda la enzima ya se produce modificada.

Usualmente se usa la modificación química para conseguir una enzima más estable que la misma sin modificar (Figura 1.14). Posteriormente esta enzima puede ser inmovilizada para ser usada como biocatalizador industrial. En otras ocasiones la enzima inmovilizada puede ser modificada para generar algún tipo de entrecruzamiento intramolecular, aumentando la estabilidad (Fernández-Lafuente, y col., 1993; Fernández-Lafuente y col., 1995; Fernández-Lafuente y col., 2001) Sin embargo en esta tesis doctoral se ha propuesto una estrategia donde se combina la modificación química y la inmovilización. En este caso la modificación química no se emplea para mejorar la estabilidad sino para mejorar el proceso de inmovilización de la misma (Figura 1.14).

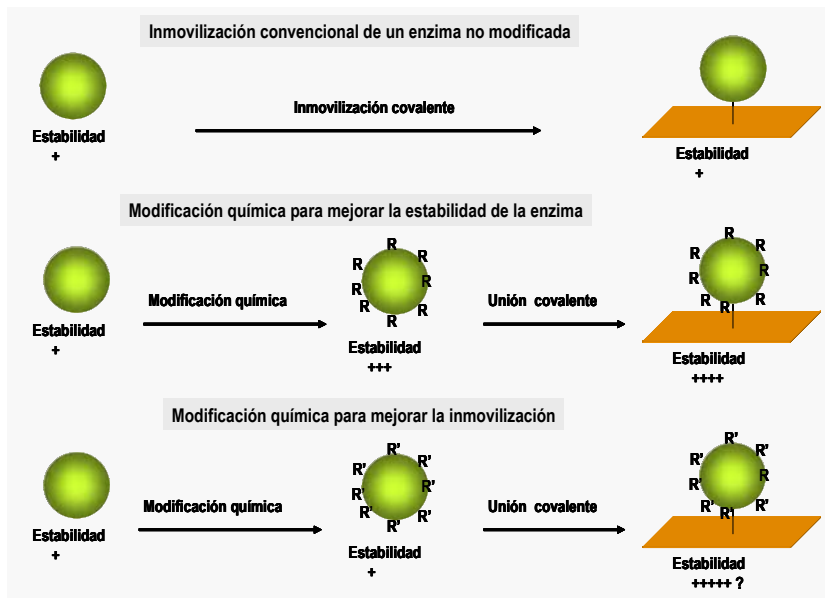


Figura1.14. Combinación de modificación química e inmovilización para lograr la estabilización

Evidentemente para llevar a cabo esta estrategia combinada necesitamos un buen sistema de inmovilización y una modificación química adecuada para mejorar la inmovilización en este sistema. Un buen soporte para observar el potencial de esta estrategia es el Glioxil agarosa, como hemos mencionado anteriormente en el punto 1.3.1 este soporte tiene todos los requerimientos de un buen sistema de inmovilización. La inmovilización covalente multipuntual en este soporte se lleva a cabo a través de los grupos ϵ -amino de las lisinas superficiales. De este modo la enzima debe ser enriquecida en grupos amino para mejorar su inmovilización/estabilización. Algunos autores han descrito la mejora de la inmovilización de proteínas en este tipo de soportes enriqueciendo su superficie en lisinas mediante modificación genética (Abian y col., 2004).

El proceso más estudiado para la modificación de proteínas con grupos aminos consiste en la activación de los carboxilos superficiales de las proteínas (Asp y Glu) con 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) en presencia de etilendiamina (EDA) (Hoare y Koshland, 1967) (Figura 1.15). Esta reacción permite la formación de un enlace amida entre el carboxilo activado por EDAC y la EDA dejando un amino primario libre y expuesto al medio. Estos nuevos

aminos primarios tienen un pK más bajo que los ϵ -amino de las lisinas, por lo tanto los aminos primarios resultantes de la modificación química son más reactivos con la superficie del soporte. Además mediante esta estrategia se puede controlar el grado de modificación química en la superficie del enzima (Hoare y Koshland, 1967; Fernandez- Lafuente y col. 1995), por lo que se puede estudiar incluso como afecta el grado de modificación a la inmovilización y que efecto tiene sobre la actividad/estabilidad del enzima.

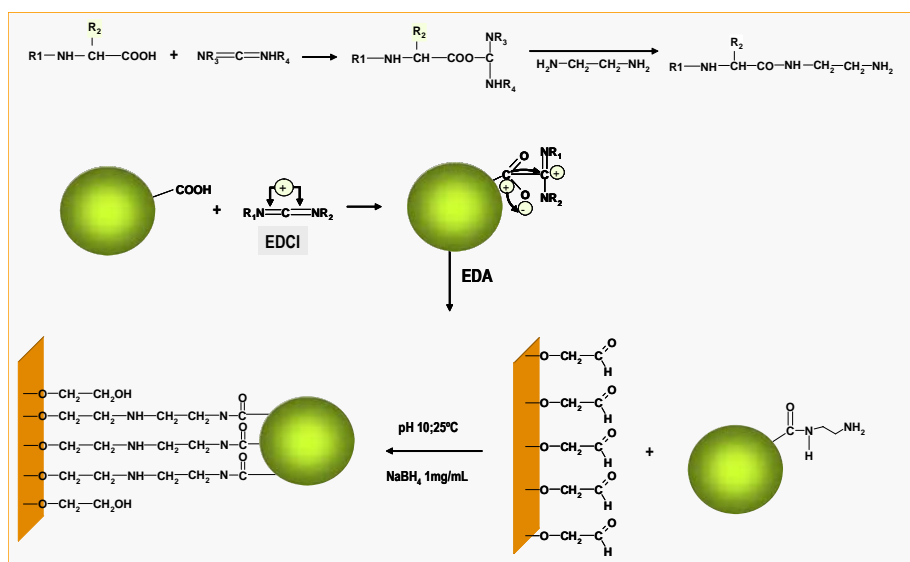


Figura 1.15. Mecanismo de afinación de proteínas mediante la activación de los carboxilos con EDCI(1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida) para posterior modificación con etilendiamina (EDA)

1.3.3. Agregados enzimáticos. Inmovilización sin soporte sólido.

Recientemente, se han desarrollado una nueva estrategia de inmovilización sin necesidad de soporte preexistente. Esta estrategia recibe el nombre de CLEAs, siglas de *Cross-linking enzyme aggregates*, es decir agregados enzimáticos entrecruzados (Cao y col., 2000; Cao y col., 2001; López-Serrano y col., 2002; Schoevaart y col., 2004, Wilson y col., 2004a). Esta técnica implica la precipitación de la enzima (que pueda ser pura o no) y posterior entrecruzamiento de los agregados usando agentes bifuncionales, como glutaraldehído u otros agentes de mayor tamaño

(p.e dextrano aldehído). Se ha descrito el uso de dextrano aldehído para el entrecruzamiento de enzimas con residuos lisinas en su centro activo, cuya modificación con glutaraldehído lleva a la inactivación enzimática. De este modo el dextrano aldehído, debido a su gran tamaño, no modifica los residuos de los centros activos porque no puede penetrar en el interior del agregado, sin embargo es capaz de llevar a cabo el entrecruzamiento molecular a través de los residuos superficiales de las enzimas a los que si puede acceder (Mateo y col., 2004).

El entrecruzamiento es necesario para la estabilización de los agregados proteicos, de lo contrario los agregados se redissolverían al eliminar el agente precipitante del medio (Schoevaart y col., 2004). Sin embargo, la estabilidad de estos agregados puede depender de la naturaleza del enzima, es decir si la enzima tiene pocos grupos capaces de reaccionar con el agente entrecruzante se formarían agregados muy poco estables mecánicamente y podría liberar moléculas de enzima al medio. Una posible solución a este problema podría ser la co-agregación de estas enzimas con polímeros que presente un gran número de grupos capaces de reaccionar con el agente entrecruzante, de este modo se facilitaría el entrecruzamiento intermolecular entre la enzima y el polímero, estabilizando la estructura del agregado (Figura 1.16). Este tipo de agregados ha sido previamente descrito (Wilson y col., 2004b) para mejorar la estabilidad frente a disolventes orgánicos debido a la gran hidrofiliicidad que presentan estos polímeros, generando una capa hidrofílica que impida el contacto entre el enzima y el disolvente.

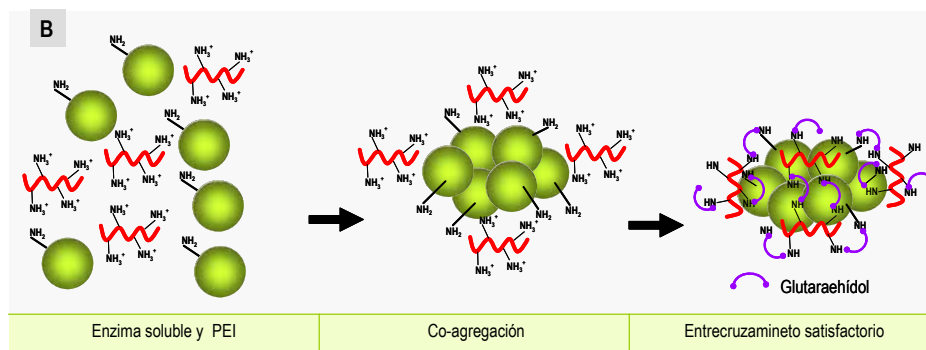


Figura 1.16. Esquema del sistema de co-agregación de enzimas en presencia de Polietilientimina(PEI) y posterior entrecruzamiento de este agregado con glutaraldehído.

1.4 Biotransformaciones con sistemas multienzimáticos. Síntesis de antibióticos semi-sintéticos.

Los sistemas acoplados usando varios pasos enzimáticos para la obtención de un producto final contribuyen a la mejora de las biotransformaciones desde un punto de vista económico y medioambiental. Por lo tanto, se pueden lograr biotransformaciones más efectivas y con menos producción de residuos.

Hoy en día, una herramienta muy potente para usar rutas metabólicas naturales o mejoradas genéticamente en microorganismos es la ingeniería metabólica. Consiste en expresar en microorganismos hospedadores rutas naturales de otros organismos o rutas modificadas para la obtención de un determinado compuesto final. Este tipo de estrategias es muy útil sobre todo en la producción de fármacos de alto valor añadido (Wilkinson y Bachmann, 2006). Se han desarrollado rutas biosintéticas en multitud de organismos para producir diferentes compuestos Kramer y col., 2003; Luo y col., 2004; Gregory y col., 2005; Salas y col 2005).

Sin embargo no hay demasiados sistemas multienzimáticos de más de dos enzimas descritos usando solamente enzimas inmovilizadas, totalmente *in Vitro*. Sin embargo el acoplamiento de dos enzimas, bien sea para conseguir un producto final o para eliminar un producto lateral de una de ellas que es contaminante o perjudicial para el proceso, si que ha sido ampliamente estudiado (Schoevaart y col., 2000; van de Velde y col., 2000). Uno de los acoplamientos que más éxito ha tenido ha sido el acoplamiento oxidasas-catalasas, sobre todo por la importancia de eliminar el peróxido de hidrogeno durante el proceso y para la formación de α -cetoácidos, hay muchos ejemplos de oxidasas acopladas a catalasas, D-aminoacido oxidasa (Brodelius y col 1981; Fernandez-Lafuente y col, 1998a) glicerol-1-fosfato oxidasa (Schoevaart y col 1999).

Entre los procesos en los que se pueden usar sistemas multienzimáticos esta la producción de 7-ACA desde CFC. En torno a este proceso van a girar gran parte de los estudios en esta tesis doctoral.

1.4.1 Conversión enzimática de Cefalosporina C en 7-ACA.

La hidrólisis enzimática de la CFC para generar 7-ACA ha traído de cabeza a muchos investigadores debido a la falta de una enzima capaz de hidrolizar directamente CFC a 7-ACA de forma efectiva (Matsuda y col 1987, Reyes y col 1990). Por este motivo, como fue descrito

previamente en el punto 1.2.2 se han desarrollado diferentes mutantes de Glutaril 7-ACA acilasas capaces de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de la cefalosporina C (Oh, B y col 2003; Pollegioni y col., 2005). Sin embargo hoy en día la única ruta totalmente enzimática para la conversión de CPC a 7-ACA consiste en un proceso en dos pasos (Nikolov y Danielsson, 1994; Conlon y col., 1995; Parmar y col., 1998). En este proceso la CFC sufre una deaminación oxidativa catalizada por DAAO, como previamente fue descrito, produciendo ácido (7- β -5 carboxi-5-oxopentanamido)-cefalosporánico (α -cetoadipil 7-ACA) y peróxido de hidrogeno, este último es capaz de descarboxilar espontáneamente el α -cetoadipil 7-ACA a Glutaril 7-ACA (GL-7-ACA). Este GL-7-ACA es hidrolizado a 7-ACA por Glutaril acilasa (GAC) (Figura 1.17A).

Este tipo de sistemas se han diseñado con catalizadores enzimáticos inmovilizados en dos reactores y en presencia de peróxido de hidrogeno (Nikolov y Danielsson 1994; Conlon y col., 1995). Sin embargo en los últimos años se ha intensificado el estudio de este proceso en un solo reactor. Se ha descrito la conversión directa de CFC a 7-ACA mediante células (*E.coli*) que sobreexpresaban una proteína de fusión DAAO-GAC (Luo y col 2004). También se ha diseñado la conversión directa de CFC a 7-ACA en un solo reactor retroalimentado, combinando células permeabilizadas de *Pichia Pastoris* productoras de DAAO y un biocatalizador inmovilizado de GAC (Tan y col., 2006).

El principal inconveniente de estos sistemas es la presencia de peróxido de hidrogeno durante el proceso capaz de inactivar las enzimas implicadas en el sistema, especialmente la DAAO (Dey y col., 1991; De la Mata y col., 2000).

Con el objetivo de mejorar este proceso se han llevado a cabo diferentes estrategias para estabilizar las diferentes enzimas implicadas en el proceso frente al peróxido de hidrogeno (Fernandez-Lafuente y col., 1999). Sin embargo la mejor solución sería la eliminación total del peróxido de hidrogeno producido en la reacción. En los últimos años se ha descrito la eliminación *in situ* del peróxido de hidrogeno formado por una oxidasa mediante la co-inmovilización de esta con una catalasa, la cual es capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno molecular, productos inocuos para la estabilidad del enzima. Este sistema se puso de manifiesto en reacciones las cuales tienen que llevarse a cabo en ausencia total de peróxido de hidrogeno para la obtención del producto final, p.e producción de β -cetoácidos (Fernandez-Lafuente y col., 1998a).

De este modo en esta tesis doctoral se ha estudiado la aplicabilidad de un sistema tri-enzimático con dos biocatalizadores, uno formado por DAAO y catalasa co-inmovilizadas y otro formado por GAC inmovilizada, para la transformación directa de CPC a 7-ACA en ausencia total de agua oxigenada (Figura 1.17B)

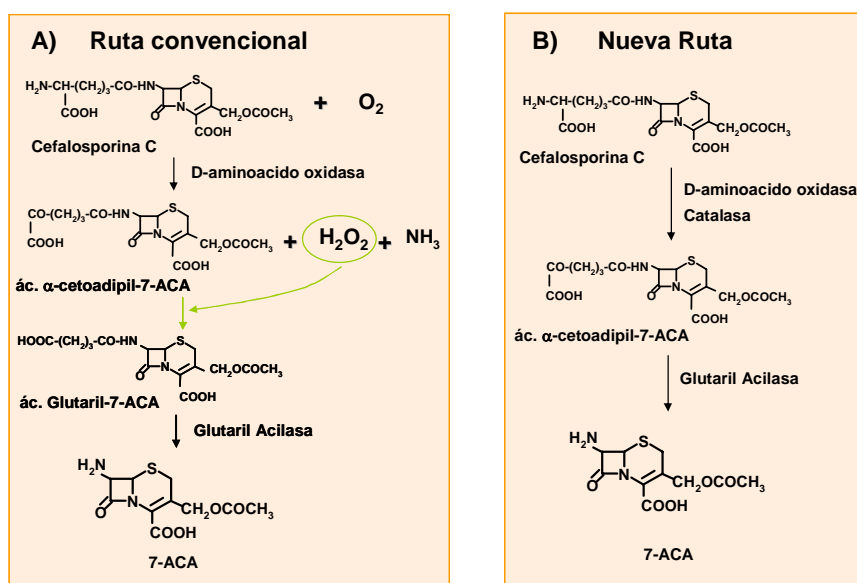


Figura 1.17. Conversión enzimática de cefalosporina C. A) Ruta convencional en presencia de peróxido de Hidrogeno.B) Nueva ruta desarrollada en ausencia de peróxido de hidrogeno.

1.4.2. Acilación enzimática del 7-ACA. Antibióticos semi-sintéticos cefalosporánicos.

La mayoría de las reacciones de síntesis de antibióticos semi-sintéticos están catalizadas por Penicilin G acilasa (PGA) (De Vroom, 1999). Esta enzima es capaz de llevar a cabo la acilación del C₇ de diferentes derivados β-lactámicos, como el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), el ácido 7-amino-3-deacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA) ó el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Incluso es capaz de llevar a cabo la acilación de los derivados modificados en el C₃ del 7-ACA (Terreni y col 2005a).

En esta tesis doctoral nos vamos a centrar en la acilación enzimática del 7-ACA para generar antibióticos semi-sintéticos cefalosporánicos o precursores de los mismos (Figura 1.3)

mediante dos estrategias, la síntesis termodinámicamente controlada (STC) y la síntesis cinéticamente controlada (SCC)

-*Síntesis termodinámicamente controlada (STC)*: Consiste en la formación de un enlace amido entre el ácido del donador de acilo y el amino primario del núcleo antibiótico (nucleófilo) (Figura 1.18).

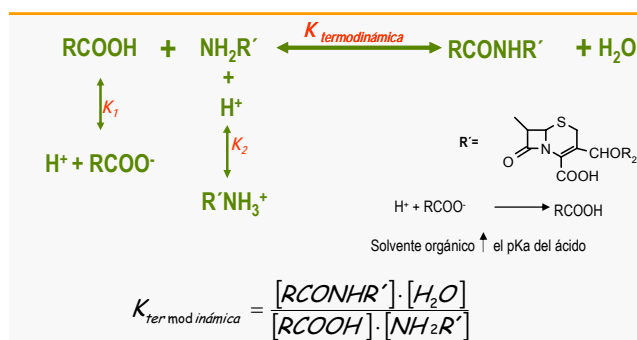


Figura 1.18. Mecanismo de reacción de síntesis de antibióticos mediante síntesis termodinámicamente controlada (STC). K_1 es la constante de disociación del ácido. K_2 constante de disociación del grupo amino.

Esta reacción está regida solamente por parámetros termodinámicos, por lo que las propiedades del catalizador no pueden afectar en ningún momento al equilibrio de la reacción ni al rendimiento final de la misma (Mateo y col., 2005a). Sin embargo para que esta reacción sea posible es indispensable que tanto el amino del nucleófilo, como el ácido del donador de acilo estén en un estado desionizado. De esta manera se puede producir el ataque nucleofílico, mediado por la enzima, del núcleo β -lactámico al donador de acilo. Así el rendimiento final de esta reacción dependerá exclusivamente de la constante de equilibrio (K_{eq}) que a su vez depende de las constantes de ionización del ácido (k_1) y del amino del grupo antibiótico (k_2). Para lograr que tanto el ácido como el grupo amino estén en su forma desionizada, el pH de la reacción debe ser tal que esté por debajo del pK del ácido y por encima del pK del amino del nucleófilo. Esto sería muy complicado de no ser por que el pK del amino primario del núcleo β -lactámico estaría entre 5-6, así, teniendo en cuenta que el pK del grupo carboxílico del donador de ácido puede estar entre 2 y 5, la reacción podría ser termodinámicamente posible a pH 5-6. Sin embargo a este valor de pH la solubilidad y la estabilidad del núcleo antibiótico son muy bajas, lo que dificultaría la reacción (Tewari y Goldberg 1988). Esto pone de manifiesto que el pH de la reacción es muy importante para el rendimiento final del proceso afectando directamente a la K_{eq} . Siendo muy importante que ambos sustratos, donador de acilo y nucleófilo tenga sus grupos ácido y amino respectivos en forma desionizada.

Por lo tanto las mejoras que se pueden llevar a cabo en esta síntesis afectan directamente a la K_{eq} de la reacción y no tanto a las propiedades del biocatalizador. De manera que el diseño del medio de reacción es clave para obtener rendimientos de antibiótico semi-sintéticos aplicables industrialmente.

De este modo la naturaleza de los sustratos sería bastante importante, puesto que cuanto mayor fuera el pK de ácido más fácil sería la STC, debido a que esta se podría llevar a valores de pH más altos beneficiando la solubilidad y estabilidad del núcleo β -lactámico. Esto ocurre en el caso del la STC de cefalotina donde el pK del ácido es 5.9-6. Por otro lado, puesto que parece que el pK del ácido es el que limita el pH al que se puede llevar la reacción, una mayor concentración de donador de acilo en relación a la del núcleo β -lactámico permitiría llevar a cabo la reacción a valores de pH más altos, debido a que un mayor número de moléculas de ácido estaría en la forma desionizada. Sin embargo las altas concentraciones de ácido provocan una gran inhibición de la PGA por lo que industrialmente podemos usar exceso moderado de ácido (en torno a 4-5 veces)(Nam y Ryu, 1985).

Por otro lado el uso de solventes orgánicos en el medio de reacción tendría un doble efecto directo en el equilibrio, por un lado afectaría a la cantidad de agua en el medio, lo que desplazaría el equilibrio hacia la síntesis en detrimento de la hidrólisis (Figura 1.18) y por otro lado al pK del grupo carboxílico del ácido, aumentando el valor de este, aumentando la concentración efectiva de este en su forma desionizada. De este modo favoreceríamos la síntesis a valores de pH más altos en los que se podría disolver el núcleo antibiótico a concentraciones más altas. Sin embargo la presencia de solventes orgánicos en el medio provoca un efecto deletéreo en la estructura enzimática, conduciendo a la inactivación del biocatalizador.

En vista de las posibles mejoras proporcionadas por solventes orgánicos en el rendimiento final, se ha intentado buscar tanto nuevos solventes capaces de aumentar el pK del grupo carboxilo y a su vez que presenten un efecto menos deletéreo para la estabilidad enzimática (Rosell y col., 1998). Por otro lado se ha intensificado la búsqueda de nuevos organismos productores de PGA, las cuales presenten una mayor estabilidad en presencia de solventes orgánicos (Alvaro y col., 1992). Además se han logrado mejoras en la estabilidad frente a solventes orgánicos de la PGA de *E.coli* mediante modificación genética (Yang y col 2002). También se han desarrollado diferentes técnicas fisico-químicas para mejorar la estabilidad de la PGA de *E. coli* en solventes orgánicos, como la inmovilización covalente multipuntual de esta enzima en ambientes hidrofílicos (Abian y col., 2001)

ó como la co-agregación de esta con polímeros muy hidrofílicos tipo polietilenimina (PEI) y dextrano sulfato (Wilson y col., 2004b).

Sin embargo a pesar de estas mejoras en el diseño del medio de reacción y en la estabilidad del catalizador en estos medios, antibióticos semi-sintéticos como la cefaloglicina ó la cefalexina presentan enormes dificultades tanto termodinámicas como cinéticas para ser sintetizados mediante STC (Diender y col 1998; Schroen y col 1999; Svedas y col 1980).

Por este motivo y como reacción modelo en esta tesis doctoral se ha elegido la STC de la cefazolina usando el 7-ACA proveniente del sistema tri-enzimático en ausencia de peróxido de hidrógeno como núcleo β -lactámico. Esta síntesis ha sido ampliamente estudiada en nuestro grupo de investigación, en el que se ha desarrollado un diseño de reacción dinámica de la biotransformación en la que se iba bajando el valor del pH del medio de reacción a medida que se iba consumiendo el núcleo β -lactámico, de forma que no se afectaba a la solubilidad de este en la mezcla, con el objetivo de mejorar la termodinámica del proceso (Fernández-Lafuente y col., 1996a)

-Síntesis cinéticamente controlada (SCC): Consiste en la acilación del núcleo antibiótico por la formación de un enlace amido a través de un donador de acilo activado (un éster o una amida) capaz de formar un complejo acil-enzima, el cuál puede ser hidrolizado por un nucleófilo, en este caso el núcleo β -lactámico, generando un antibiótico semi-sintético (Figura 1.19). Esta estrategia es mucho más complicada que la STC debido a que la PGA además de la reacción de síntesis (V_s) también cataliza dos reacciones de hidrólisis no deseadas, la hidrólisis del éster ó amida (V_{h1}) y la hidrólisis del antibiótico formado (V_{h2}) (Figura 1.19). De este modo y debido a esta última hidrólisis el rendimiento máximo es transitorio puesto que el enzima es capaz de hidrolizar el producto final. Por lo tanto en la SCC, al contrario de lo que ocurría en la STC, las propiedades catalíticas del enzima pueden alterar el rendimiento máximo de la reacción. Este rendimiento viene determinado por dos parámetros, la *Tasa $s/h1$* y la *Tasa $s/h2$* . La primera nos predice el rendimiento máximo teórico obtenido si no hubiera hidrólisis del producto, y la segunda nos habla de la eficiencia del catalizador para hidrolizar dicho producto.

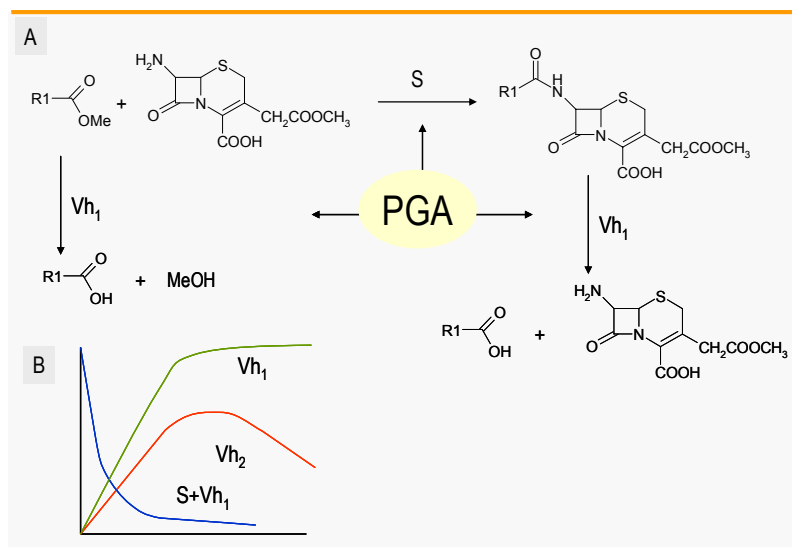


Figura 1.19. Síntesis cinéticamente controlada (SCC) de antibióticos. A) Esquema de la reacción de SCC Vh1: Velocidad de hidrólisis del éster; Vh2: Velocidad de hidrólisis del antibiótico; S: Velocidad de síntesis del antibiótico B) Curso de la reacción de SCC. (-) Curso de producción del ácido (-) Curso de producción del antibiótico (-) Curso de consumo del éster.

El que aparezcan estas dos actividades hidrolíticas en el proceso de la reacción es el precio que tenemos que pagar por usar como “sintetasa” ó tranferasa”, un enzima que naturalmente fue diseñada para reacciones de hidrólisis. Este es un claro ejemplo de promiscuidad enzimática, debido a que usamos una enzima para desarrollar una actividad completamente opuesta a la actividad para la que fue diseñada.

El mecanismo por el cual la enzima lleva a cabo la reacción de síntesis no está muy claro. Se sabe que la enzima debe formar un complejo acil-enzima con el donador de acilo y este complejo puede ser atacado por una molécula de agua, generando el correspondiente ácido (Vh1) o puede ser atacado por el núcleo β -lactámico, generando el correspondiente antibiótico (S) (Figura 1.19). No está claro la secuencia en la que se lleva el proceso de síntesis, se discute si se forma primero el

complejo acil-enzima o si se absorbe primero el nucleófilo. Muchos autores asumen que el nucleófilo se une al centro activo posteriormente a la formación del complejo acil-enzima y dependiendo de si el nucleófilo es el núcleo β -lactámico o el agua, el producto será el antibiótico o el ácido respectivamente (Youshko y Svedas, 2000a; Schoröen y col 2001; Alkema y col 2003) (Figura 1.20).

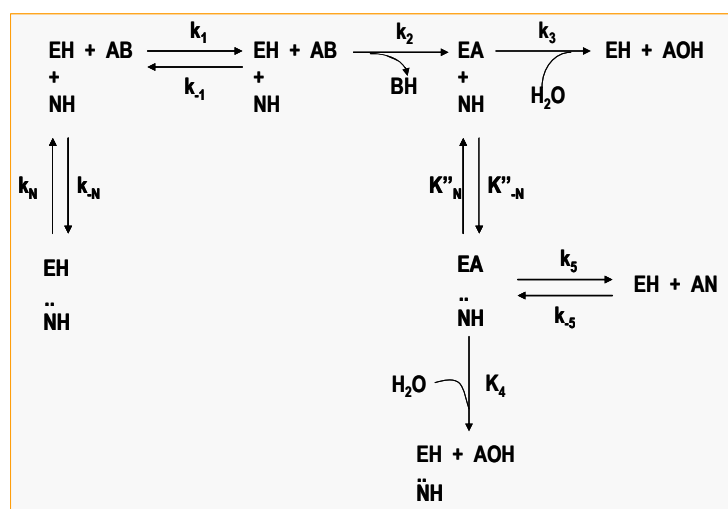


Figura 1.20. Mecanismo de síntesis cinéticamente controlado de PGA. EH= enzima libre; AB= donador de acilo; NH=núcleo antibiótico; BH=grupo saliente; AOH=cadena lateral; AN=antibiótico; EA=complejo acil-enzima; EH⁺NH= complejo acil-enzima-núcleo. Los dos puntos representan enlaces no covalentes

Incluso otros autores han propuesto que es el β -lactámico se puede unir al centro activo antes o después de la formación del complejo acil-enzima, pero solamente aquellos centros activos donde el núcleo β -lactámico se una antes de la formación del complejo acil-enzima, serán capaces de sintetizar antibiótico, esta nueva aproximación complica el mecanismo de la reacción (Gonzalves y col, 2000; Gonzalves y col 2003).

De todos modos, lo que queda claro es que es necesario la formación del complejo acil-enzima para la síntesis del antibiótico, así los centros activos que hayan formado el complejo acil-enzima y sean atacados por un núcleo β -lactámico serán capaces de generar como producto el antibiótico semi-sintético (Figura 1.20). Y las propiedades del enzima para formar el complejo acil-enzima y para absorber el núcleo β -lactámico a su centro activo, van a determinar las propiedades cinéticas del biocatalizador para llevar a cabo la síntesis de antibióticos.

En vista de lo importante que es la enzima en esta estrategia (SCC) se han desarrollado numerosas estrategias para mejorar esta actividad "sintetasa" de la PGA, con el objetivo de mejorar su comportamiento en síntesis de antibióticos. En primer lugar se ha estudiado el medio reacción, siendo bastante evidente que el mejor comportamiento del enzima en la SCC de muchos antibióticos semi-sintéticos se consigue a pHs de reacción entre 6-6.5 (Ospina y col., 1996; Aguirre y col., 2002; Gonzalves y col 2002) .La presencia grandes concentraciones de sustratos mejoraría los rendimientos debido a que las enzimas estarían saturadas de los sustratos, incluso se lograron excelentes resultados cuando los sustratos estaban en condiciones de saturación (Youshko y col., 2000b). Además, en la reacción se pone un exceso de donador de acilo con el objetivo de conseguir la conversión total del núcleo antibiótico (Youshko y col 2002a; Youshko y col 2002b; Wegman y col 2002)). El mayor problema de estas mejoras es la inhibición de la actividad sintética de la PGA debido sobre todo a la alta concentración de núcleo β -lactámico.

Por lo tanto, generalmente en términos de productividad y selectividad y teniendo en cuenta los costes energéticos las condiciones de temperatura y pH estarían en torno a 20-25° C y pH=6-6.5 respectivamente (Giordano y col., 2006).

Otra estrategia para mejorar los rendimientos en SCC es la búsqueda de nuevas PGAs en la biodiversidad con mejores propiedades en términos de Tasa $s/h1$ (Hernandez-Justiz y col., 1999; Gabor y col., 2005) para la síntesis de antibióticos semi-sintéticos.

Además se han puesto de manifiesto, que la presencia de metanol en el medio de reacción mejora las propiedades cinéticas de la enzima en la síntesis de diferentes antibióticos (Fernandez-Lafuente y col 1998; Travascio y co., 2002; Gonzalves y col., 2003). No hay una explicación clara para el efecto del metanol sobre el enzima, algunos autores relacionan este aumento en la Tasa $s/h1$ a una menor hidrólisis aparente del éster por razones termodinámicas, puesto que el metanol es uno de los productos de hidrólisis de los ésteres metílicos, frecuentemente usados en SCC (Kasche, 1985). Sin embargo otros autores defienden la hipótesis de los cosolventes orgánicos, en este caso el metanol, pueden interaccionar con zonas hidrofóbicas de la PGA distorsionando su estructura (Kim y col., 1996), de este modo la enzima puede sufrir cambios en su estructura terciaria, generando una conformación del centro activo distinta a la del enzima en solución acuosa, variando las propiedades sintéticas de la enzima, mejorando la Tasa $s/h1$

Hasta ahora hemos hablado de la mejora de la Tasa s/h_1 , pero sin embargo no hay muchas investigaciones en las que mejore la tasa s/h_2 modificando las propiedades del enzima. Por el contrario, con un diseño adecuado del medio de reacción se puede conseguir la extracción del antibiótico del medio donde actuó la enzima, mejorando la Tasa s/h_2 debido a que el producto no puede ser hidrolizado por el enzima al estar en una fase no accesible para el enzima (Figura 1.22).

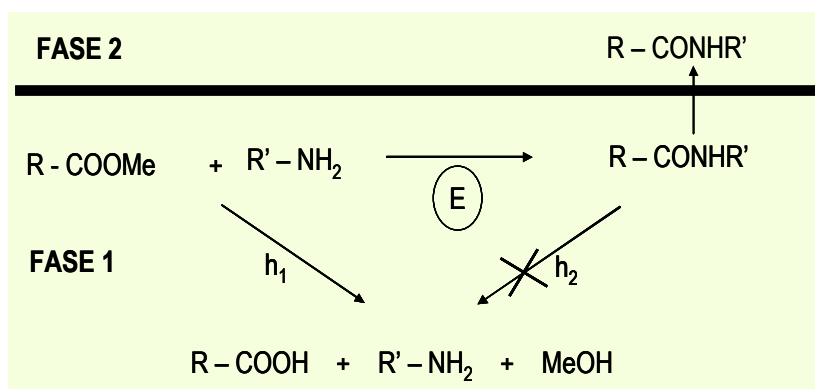


Figura 1.21. Sistema bifásico para la producción de antibióticos semi-sintéticos mediante una estrategia de Síntesis cinéticamente controlada. R-COOMe: Donador de acilo activado; R'-NH₂: Núcleo antibiótico; R-COOH: ácido; R-CONHR'; Antibiótico. S: Síntesis; h₁: hidrólisis del éster; h₂: hidrólisis del antibiótico.

Sin embargo, conseguir un medio de reacción bifásico donde los sustratos estén en una fase y los productos en otra no es tarea fácil para estos compuestos debido a que la naturaleza de productos y sustratos es bastante similar. Esto se consiguió para la síntesis de la cefaloglicina (Hernández-Justiz y col., 1998) y para la síntesis del precursor del cefamandol (Terreni y col., 2002), obteniéndose para ambos grandes mejoras tanto en los rendimientos máximos como en la estabilidad del rendimiento máximo.

2. OBJETIVOS

1. Estabilización de la Glutaril acilasa mediante diferentes técnicas fisico-químicas, para su uso como biocatalizador industrial.

-Estabilización y caracterización de derivados insolubles de Glutaril acilasa mediante diferentes técnicas de inmovilización covalente.

-Aumento de la cantidad de grupos aminos en la superficie de Glutaril acilasa con el objetivo de mejorar la inmovilización covalente en soportes activados con grupos glioxiles.

- Estabilización de Glutaril acilasa mediante agregación de esta y posterior entrecruzamiento covalente.

2. Producción de 7-ACA desde Cefalosporina C mediante una nueva ruta en ausencia de peróxido de hidrogeno mediante un sistema tri-enzimático con dos biocatalizadores distintos.

-Diseño de un sistema de producción de 7-ACA desde Cefalosporina C en ausencia de peróxido de hidrogeno.

-Mejora de la actividad α -cetoadipil-7-ACA acilasa de Glutaril acilasa mediante técnicas de ingeniería genética.

3. Inmovilización-rigidificación de Penicilina G acilasa mediante el desarrollo de nuevos soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol.

4. Mejora de la síntesis cinéticamente controlada de antibióticos. Mediante técnicas de ingeniería del medio de reacción y técnicas de ingeniería del biocatalizador.

-Efecto del sistema de inmovilización en las propiedades sintéticas de la Penicilina G acilasa en síntesis cinéticamente controlada de antibióticos β -lactámicos.

- Efecto del medio de reacción en la Síntesis síntesis cinéticamente controlada de antibióticos β -lactámicos.
- 5. Acoplamiento del proceso producción del 7-ACA desde cefalosporina C con la síntesis de antibióticos semi-sintéticos en dos pasos y sin etapas de purificación intermedias.**

3. MATERIALES

Proveedor	Enzimas y derivados enzimáticos
Donada por Antibióticos S. A. (León, España)	Penicilina G acilasa (PGA) (250 UI/mL) de <i>Escherichia coli</i> .
Fluka (Buchs, Switzerland)	PGA de <i>Escherichia coli</i> inmovilizada sobre Eupergit® (FLUKA-PGA)
Donada por Bioferma S.A (Murcia, España)	D-aminoácido oxidasa de <i>Trigonopsis variabilis</i> (DAAO)
Fluka (Buchs, Switzerland)	Catalasas de hígado bovino (CATb)
Suministrada por Roche (Basel, Suiza)	Gutaril acilasa de <i>Pseudomonas sp</i>
Suministrado por Roche (Basel, Suiza)	Derivado inmovilizado de Gutaril acilasa de <i>Pseudomonas sp</i>
Soportes	
Donado por Hispanagar (Burgos, España)	Agarosa con distinto grado de entrecruzaiento 10% (10 BCL), 6% (6 BCL) y 4% (4BCL)
Amershan Biosceinces (Uppsala, Suecia)	Agarosa 4BCL activada con Bromuro de cianógeno (AgBrCN) y Q Sepharosa
Donado por Resindion S.R.L. Mitsubishi Chemical Co. (Milán, Italia)	Soportes epóxido monofuncionales Sepabeads (EC-EP), soportes heterofuncionales amino-epóxido Sepabeads y soportes amino Sepabeads (EC-EA) (solo posee como grupos funcionales aminos primarios)
	Soportes agarosa activados con grupos aldehídos (Glioxil agarosa (Gx-agarosa) fueron sintetizados según se describe en Guisan, 1988
Sustratos	
Donados por Bioferma S.A	Ácido glutaril 7-aminocefalosporánico (GL-7-ACA), Cefalosporina

<i>(Murcia, España)</i>	C sódica
<i>Donada por Antibióticos S. A. (León, España)</i>	Penicilina G potásica y ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA)
<i>Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis MO, EEUU)</i>	Ácido fenilacético (AFA)
	Peróxido de hidrógeno
	Fluorescamina
	6-nitro-(3-fenilacetamido)benzoico (NIPAB)
<i>Fluka (Buchs, Suiza)</i>	Metil D (+) α -hidroxifenilacetato.
Proveedor	Productos Químicos
<i>Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)</i>	Polietilenimina (PEI) 700, 25.000, 70.000 y 1.000.000 Daltons. Borohidruro de sodio (NaBH ₄). Etilendimaina. 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDAC), 2,3 epóxipropanol (Glicidol), Glicerol
<i>Fluka (Neu Ulm, Alemania)</i>	Glutaraldehído 25%
<i>Pierce (Rockford, IL, EEUU)</i>	Reactivo de Bradford
<i>Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)</i>	Solución 30 % acrilamida/bisacrilamida, Solución de Bisacrilamida 2%
<i>Merck, (Schulhardt, Alemania)</i>	Polietilenglicol (PEG) 600 y 6000 Daltons, metaperiodato de sodio

El resto de los reactivos y solventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico.

4. METODOS.

Todos los resultados presentados en el presente trabajo representan valores promedios de, al menos tres experimentos. En todos los casos el error experimental no fue superior al 5%.

4.1 Producción y purificación de PGA y GAC.

4.1.1. Diálisis de PGA y GAC comerciales.

La preparación comercial de PGA donada por Antibióticos S.A fue dializada 5 veces frente a 50 volúmenes de tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 a 4°C

Por otro lado la preparación comercial de GAC donada por Bioferma S.A fue diluida 1/ 5 en fosfato de potasio 25 mM a pH 7.0 y después dializada a 4° C frente a 100 volúmenes de fosfato de potasio 5 mM a pH 7. La enzima dializada fue centrifugada (12000 rpm durante 30 minutos a 4° C) y el sobrenadante, el cuál contiene 16 UI/mL, fue usado para los posteriores ensayos. Después de este proceso se recupero más del 90% de la actividad inicial

4.1.2. Expresión y purificación de PGA de *E.coli* y GAC de *Pseudomonas SY-77*.

Se han utilizado 6 mutantes distintos de PGA de *E.coli*; Gln B380, Ala B361, Ser B201, Ser B9, Gln B112 y Ser A86. En cada una de estas posiciones el aminoácido de la secuencia nativa fue sustituido por cisteína según fue descrito en Grazu, 2006. En el caso de GAC de *Pseudomonas SY-77* se utilizaron los siguientes mutantes: Y178H, N266H, Y178H/N266H y Y178F/F375H. Los mutantes simples fueron construidos según fue descrito por Sio y col., 2002; Otten y col., 2002. Los mutantes dobles fueron construidos según Sio, 2005.

Para expresar y purificar tanto la PGA nativa como los diferentes mutantes usados en esta Tesis Doctoral se siguió el protocolo descrito por Grazu, 2006.

En el caso de la GAC nativa y los mutantes usados en esta Tesis Doctoral, la expresión y purificación de estas proteínas se llevó a cabo de acuerdo al protocolo desarrollado por Sio y col., 2002.

4.2. Ensayos de actividad enzimática

- *Determinación de la actividad hidrolasa de Glutaril acilasa (GAC).*

La actividad de esta enzima tanto en su forma inmovilizada como en su forma soluble fue determinada mediante tres métodos diferentes.

1) Con un valorador. automático (Mettler Toledo, DL50) donde la actividad fue determinada de forma directa mediante la determinación del ácido glutámico liberado de la hidrólisis de GL-7ACA. El ensayo fue llevado a cabo añadiendo 0.1 mL de enzima soluble o inmovilizada a 15 mL de una solución 10 mM de GL-7ACA en fosfato de potasio 100 mM a pH 7.5, este pH fue mantenido constante mediante adiciones secuenciales de NaOH 25 mM en función de la variación del pH. Durante todo el análisis la temperatura fue de 25°C.

2) Colorimétricamente, donde se valoró de forma indirecta el 7-ACA producido en la hidrólisis de GL-7ACA con fluorescamina según describió Reye y col., 1989. El ensayo fue llevado a cabo en placas de 96 pocillos a 25° C. 100 µL de una solución GL-7ACA 10 mM en fosfato de sodio 100 mM a pH 7.5 fueron añadidos a 100 µL de una solución enzimática. Después de 30 o 60 minutos de reacción, se tomaron 40 µL de la mezcla y se añadieron 140 µL de acetato sódico 100 mM a pH 4 para detener la reacción, después se añadieron 20 µL de una solución 1 mg/mL de fluorescamina, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1h para desarrollar color, después la absorbancia fue determinada en un espectofotómetro lector de placas de 96 pocillos a una longitud de onda de 415 nm. Este ensayo nos ofreció la posibilidad de analizar espectofotométricamente la actividad de esta enzima reduciendo de una manera significativa el volumen de reacción.

3) *via* HPLC, en este ensayo fue valorada cantidad de 7-ACA formada a partir de la hidrólisis de los diferentes sustratos ensayados. Entre 0.05-0.1g de derivado enzimático fue incubado con 1.6 mL de una solución de sustrato a una concentración determinada. El 7-ACA fue determinado por HPLC con una columna Kromasil C8 (5µm, 250x4.6 mm), la fase móvil fue una mezcla isocrática de acetato amónico 20 mM y acetonitrilo a pH 5.2, en una proporción volumétrica de 95:5. Los diferentes compuestos fueron detectados a una longitud de onda de 254 nm, con tiempos de retención, a un flujo de 1.5 mL/min, de 4.9, 6,7 y 12.3 min para el 7-ACA, el α -cetoamidopirrolidino 7-ACA y el GL-7-ACA respectivamente. Otros picos minoritarios fueron considerados como productos laterales.

En los tres ensayos, una unidad de actividad glutaril acilasa se definió como la cantidad de enzima capaz de generar 1 µmol de ácido glutámico o 7-ACA por minuto en el ensayo directo (valoración ácido/base) ó indirecto (colorimétrico ó HPLC), respectivamente.

-Determinación de la actividad enzimática de D-aminoacido oxidasa(DAAO).

La actividad DAAO se analizó espectrofotométricamente usando Cefalosporina C como sustrato y midiendo el incremento en la absorbancia a 445 nm y 25°C gracias a la reacción catalizada por la peroxidasa acoplada a *o*-fenil dedimaina en la que se descompone el peróxido de hidrogeno proveniente de la deaminación oxidativa de la CFC llevada a cabo por la DAAO. La mezcla de reacción se preparó con 1.5 mL de una solución 6.5 mM de Cefalosporina C en fosfato de potasio 100 mM a pH 7.5, 0.5 mL de *o*-fenilendiamina 1.85 mM en agua destilada y 0.1 mL de una solución de peroxidasa 1 mg/mL en tampón fosfato de potasio 100 mM a pH 7.5. La reacción se inició por a adición de 0.1 UI DAAO como máximo.

Una unidad de actividad DAAO se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de CPC por minuto en las condiciones antes mencionadas.

-Determinación de la actividad catalasa.

La actividad catalasa fue determinada espectrofotométricamente, monitorizando la descomposición de H₂O₂ mediante la disminución de la absorbancia a 240nm con el tiempo. Así, 2.9 mL de una solución 35 mM de H₂O₂ en tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 7.5, fueron incubados con 0.2 mL de solución enzimática. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a 25 °C y se utilizó un coeficiente de extinción molar para el peróxido de hidrogeno de 39.4 M⁻¹cm⁻¹ (Nelson y Kesow, 1972).

Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μ mol de peróxido de hidrogeno por minuto en las condiciones previamente mencionadas.

- Determinación de la actividad hidrolasa de PGA.

La determinación de esta actividad se llevo a cabo con dos sustratos:

1) Actividad de hidrólisis de la Penicilina G potásica. Se determinó de forma continua por valoración potenciométrica (valorador automático Mettler Toledo DL50) con NaOH 20 mM como reactivo titrante para determinar la cantidad de ácido fenilacético liberado por la hidrólisis de la Penicilina G. La reacción enzimática se llevo a cabo en una mezcla de reacción que contenía la solución enzimática (soluble o suspensión inmovilizada), 20 mL de penicilina G potásica 30 mM en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8 a una temperatura controlada de 25°C (Alvaro, 1988).

2) Determinación de hidrólisis de NIPAB. La actividad con este sustrato se

determinó mediante un método colorimétrico midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm generado por la aparición en el medio de reacción del ácido 3-amino-6-nitrobenzoico, resultante de la hidrólisis enzimática del NIPAB. Las condiciones de reacción para llevar a cabo la hidrólisis de este sustrato fueron; NIPAB 0.15 mM en tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 7.5 y 25°C. El ácido 3-amino-6-nitrobenzoico presentó un coeficiente de extinción molar de $9090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en las condiciones del ensayo anteriormente descritas.

4.3 Análisis de proteínas.

-Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración proteica de las disoluciones enzimáticas preparadas durante toda la parte experimental de esta Tesis Doctoral fue determinada utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bovino como proteína patrón.

-Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Las electroforesis de las diferentes enzimas se realizaron según la técnica descrita por Laemmli, 1970. Las preparaciones enzimáticas tanto en su forma soluble como en su forma inmovilizada fueron hervidas durante 5 minutos en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 625 mM pH 6.8, 2% de sodio-dodecil sulfato (SDS), 5% de β -mercaptoetanol, 10% de glicerol y 0.005% de azul de bromofenol). Los sobrenadantes de estas preparaciones enzimáticas así procesadas, fueron analizados por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posteriormente teñidos con azul de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971) para determinar las diferentes bandas proteicas separadas por su movilidad electroforética.

4.4 Preparación de soportes utilizados para la inmovilización de enzimas.

4.4.1 Soportes activados con grupos amino primarios.

Se sintetizaron soportes aminados mediante la activación de soportes glioxil agarosa con etilendiamina (MANAE-agarosa) según el protocolo descrito en Fernandez-Lafuente y col 1993. Otro tipo de soportes aminados fueron los sintetizados desde glioxil agarosa recubiertos con polímeros hidrofílicos policationicos con grupos aminos primarios. En nuestro caso los polímeros elegidos fueron polietileniminas (PEIs) de diferentes pesos moleculares (0.7, 25, 60 y 600 kDa). La preparación de estos soportes fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito por Mateo y col.,

2000b. A estos soportes se los denominó agarosa-PEI. Por otro lado, este recubrimiento con PEI también puede ser llevado a cabo sobre soportes Sepabeads EC3-EP, debido a que los epóxidos también son capaces de reaccionar con los amino primarios de la PEI en las mismas condiciones anteriormente descritas para el glioxil agarosa. Este último soporte se denominó Sepabeads-PEI

4.4.2 Soportes activados con grupos glutaraldehído.

Los soportes modificados con glutaraldehído fueron preparados mediante la activación total de los grupos amino primarios de los soportes MANAE agarosa o Sepabeads EC-EA. Para llevar a cabo la síntesis de estos soportes, 10g de soporte con grupos amino primarios fueron incubados dejando reaccionar esta suspensión durante 16 h a 25° C en agitación suave. Posteriormente el soporte fue filtrado y lavado exhaustivamente con fosfato de sodio 25 mM pH 7 y agua destilada

4.4.3 Soportes bifuncionales con grupos glioxil y grupos tiol

Estos soportes se sintetizaron mediante la activación parcial de la agarosa con epíclorohidrina (EPI) seguida de una hidrólisis ácida controlada, una oxidación con periodato y finalmente se llevó a cabo la tiolación de los epóxidos remanentes.

10 g de agarosa 1BCL fueron incubados con 100 mM de ácido sulfúrico durante 2h a 25° C en una relación 1:10 (g soporte/mL de ácido). Posteriormente este soporte fue lavado con exceso de agua destilada para eliminar todo el ácido remanente. Se oxidaron los dioles presentes en este soporte después de la hidrólisis ácida con una cantidad estequiométrica de meta-periodato sódico, de modo que por cada mol de grupos dioles que estén presentes en la agarosa se necesite un mol de meta-periodato. La oxidación se llevó a cabo durante 2h a 25° C. Una vez oxidado el soporte, tenemos grupos epóxido (resultantes de la hidrólisis ácida parcial) y grupos aldehído. Los grupos epóxido fueron tiolados mediante la incubación del soporte con una solución de sulfuro de sodio 10 mM preparada en bicarbonato de sodio 100mM a pH 10 en una relación 1:20 (g soporte/mL de sulfuro de sodio). Esta incubación se prolongó durante 30 minutos a 25° C.

Una vez finalizado el proceso de tiolación, el soporte fue lavado abundantemente con agua destilada para eliminar el exceso de sulfuro de sodio. Este punto es muy importante porque trazas de sulfuro nos pueden dificultar la posterior inmovilización por intercambio tiol-disulfuro. Estos soportes finalmente fueron activados con un exceso de 2-piridil-disulfuro (2-PDS) para llevar a cabo la inmovilización de proteínas tioladas mediante intercambio tiol-disulfuro.

4.5 Inmovilización de enzimas en diferentes soportes.

En todos los casos el curso de inmovilización se controló midiendo la actividad en el sobrenadante y en la suspensión y la cantidad de proteína en el sobrenadante (Bradford 1978) a diferentes tiempos. Además, fue preparada una suspensión de referencia teniendo exactamente la misma concentración enzimática que la solución de inmovilización y en las mismas condiciones de inmovilización (pH, T, fuerza iónica) añadiendo la misma cantidad de resina inerte, en vez del soporte activado, susceptible de la inmovilización enzimática. Esta referencia nos determina la inactivación de la enzima soluble en las condiciones de inmovilización.

4.5.1 Inmovilización enzimática sobre soportes glioxil agarosa (Gx-agarosa).

Las diferentes soluciones enzimáticas preparadas en bicarbonato de sodio 100 mM, pH 10 fueron añadidas a la cantidad adecuada de soporte glioxil agarosa totalmente activado (75 y 250 μ moles de grupos aldehídos para la agarosa 6BCL y 10 BCL, respectivamente (Tabla 2.1). Las condiciones de inmovilización fueron pH 10 y 25° C en agitación suave. Cuando se alcanzo la máxima inmovilización posible, el derivado fue reducido con borohidruro sódico (NaBH_4) sólido, de modo que la concentración final de éste en la suspensión de inmovilización fuese 1 mg/mL. Este proceso de reducción es necesario para transformar las bases de Schiff (enlaces covalentes reversibles formados en el proceso de inmovilización entre los aminos primarios de la enzima y los aldehídos del soporte) en enlaces covalentes irreversibles (aminos secundarios).

Enzima	Condiciones de inmovilización	Tipo de soporte
Penicilina G acilasa(PGA)	100 mM de ácido fenilacético, 25% de glicerina en bicarbonato de sodio 100 mM pH 10	Agarosa 10 BCL activada con grupos glioxil (200 mmoles/g)
Glutaril acilasa(GAC)	bicarbonato de sodio 100 mM pH 10	Agarosa 6 BCL activada con grupos glioxil (75 mmoles/g)
Co-inmovilización D-aminoácido oxidasa (DAAO) y catalasa (CATb)	bicarbonato de sodio 100 mM pH 10	Agarosa 6 BCL activada con grupos glioxil (75 mmoles/g)

Tabla 2.1. Condiciones de inmovilización de diferentes enzimas sobre soportes glioxil-agarosa

4.5.2 Inmovilización enzimática en soportes activados con glutaraldehído.

Todas las inmovilizaciones sobre este tipo de soportes fueron llevadas a cabo en tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 7 y 25 °C en agitación suave a diferentes relaciones soporte:solución de inmovilización. La relación de inmovilización fue de 1:2 y 1:10 (v:v)(soporte:solución de inmovilización) ofreciendo 16 UI/g y 20 UI/g para GAC y PGA ,respectivamente. Una vez preparados los derivados inmovilizados fueron lavados con tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 7 y almacenados a 4° C.

4.5.3 Inmovilización enzimática sobre agarosa activada con bromuro de cianógeno.

Antes de llevar a cabo la inmovilización en esta resina comercial, dicho soporte fue sometido a un tratamiento de hidratación en medio ácido. De este modo, 2 gramos secos de este soporte fueron incubados con 7 mL de una solución 1 mM de ácido clorhídrico durante 15 minutos bajo agitación suave. Después de este tratamiento el soporte fue lavado en exceso con una solución de bicarbonato 100 mM y NaCl. 500 mM, pH 8.3.

Una vez preparado el soporte, 2 gramos del mismo fueron incubados con 7 mL de solución enzimática (4,6UI/mL y 5,7UI/mL para GAC y PGA respectivamente) en bicarbonato de sodio 100 mM, pH 8,3, mM y NaCl. 500 mM, pH 8.3, a 25° C y bajo agitación suave. El proceso de inmovilización se prolongó durante 1h, después el derivado enzimático fue filtrado a vacío y lavado con una solución de bicarbonato de sodio 100 mM y NaCl 500 mM a pH 8.3. Después el derivado fue bloqueado con 10 mL de 1M de etanolamina a pH 8 durante 2h a 25° C bajo agitación suave y posteriormente lavado con una solución 25 mM de fosfato de sodio pH 7 para ser finalmente almacenado a 4°C.

4.5.4 Inmovilización de enzimas en resinas epoxi-acrílicas

-Resinas totalmente activadas con grupos epóxido (Sepabeads EC-EP). GAC y PGA fueron inmovilizadas en este tipo de soportes (Mateo, 2000a; López-Gallego y col., 2004). En ambos casos las soluciones enzimáticas fueron preparadas en tampón fosfato 1 M pH 7 a 25°C bajo agitación suave. La relación de inmovilización fue de 1:2 y 1:10 (soporte:solución de inmovilización) ofreciendo 16 UI/g y 20 UI/g para GAC y PGA, respectivamente.

-Resinas heterofuncionales con grupos epóxido y grupos amino (Sepabeads EC-HFA).

Solo GAC fue inmovilizada en este tipo de soportes (López-Gallego y col., 2004). La solución enzimática de GAC fue preparada en fosfato de sodio 25 mM pH 7 a 25° C bajo agitación suave, la relación de inmovilización fue 1:2 (soporte/solución de inmovilización). Se ofrecieron 16 UI/g de GAC. En estas condiciones estamos favoreciendo la adsorción iónica del enzima en el soporte.

-Bloqueo de los soportes activados con grupos epóxidos. Para parar la reacción entre los grupos del enzima y los grupos epóxido del soporte (Sepabeads EC-EP ó EC-HFA) se llevo a cabo un bloqueo de estos últimos con glicina. Este bloqueo se llevó a cabo cuando los procesos de inmovilización fueron completados, de este modo el soporte quedará completamente inerte, pudiendo almacenarse sin ningún problema. El protocolo de bloqueo consistió en la incubación de 1g del soporte con grupos epóxido, en el que ha sido previamente inmovilizada la enzima, con 4 mL de una solución de glicina 3M a pH 8.5, durante 16 h, a 4° C, bajo agitación suave. Después de este tiempo los derivados fueron lavados con agua destilada en exceso, para poder ser almacenados a 4° C.

4.5.5 Adsorción iónica de GAC en diferentes soportes activados con grupos amino primarios.

GAC fue adsorbida en los soportes descritos en 4.4.1, MANAE-agarosa, Sepabeads-PEI, además de en el soporte comercial Sepabeads EA. Esta adsorción fue llevada a cabo mediante la incubación de una solución enzimática de GAC 8 UI/ mL en fosfato de sodio 5 mM a pH 7 con este tipo de soportes a 25 °C y bajo agitación suave, durante 3h (Alonso y col., 2004). En todos los casos, la relación de inmovilización fue 1:2 (soporte:solución enzimática). Después de la adsorción la suspensión fue filtrada y lavada con el mismo tampón de inmovilización para almacenarla a 4°C.

4.5.6 Inmovilización de PGA en soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol.

Para inmovilizar los diferentes mutantes de PGA tiolados genéticamente en los soportes descritos según el punto 4.4.3, es necesario la reducción del grupo tiol mediante Di-tiotreitol. La enzimas solubles se incubaron durante 30 minutos con una solución de 50 mM de Di-tiotreitol a pH 8, posteriormente estas enzimas fueron gelfiltradas en columnas P-10, para eliminar el exceso de Di-tiotreitol. Una vez reducidas las enzimas se incubaron en una relación 1:10 (g soporte/ mL solución

enzimática) con los soportes bifuncionales glioxil-tiol a pH 7 y 25° C. La inmovilización fue llevada a cabo durante 24 h. Una vez completada esta primera etapa de inmovilización a través de un intercambio tiol-disulfuro entre la enzima y el soporte, los derivados fueron filtrados e incubados con una solución de 100mM de ácido fenilacético y glicerina al 25% en bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 y 25° C durante 3h. Esta incubación tiene el objetivo de establecer uniones covalentes multipuntuales entre los grupos glioxil del soporte y los grupos ϵ -amino de las lisinas superficiales de las enzimas.

4.6 Entrecruzamiento con glutaraldehído de derivados de GAC adsorbidos por intercambio iónico en soportes activados con aminos primarios

Este tratamiento fue llevado a cabo con los derivados obtenidos en el punto 4.5.5. Se preparó una suspensión (1:4)(v:v,) (soporte: solución de glutaraldehído). Se usaron soluciones de glutaraldehído a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.65, 1 y 2%) en fosfato de sodio 5 mM, pH 7 y 25°C, bajo agitación suave, durante 1h. Después esta suspensión fue filtrada y lavada con un exceso de fosfato de sodio 5 mM, pH 7. Posteriormente, los derivados enzimáticos húmedos fueron incubados a 25°C durante diferentes periodos de tiempo (1,5, 13, 30 días). Después de estas incubaciones, las actividades y las estabildades térmicas de estos derivados enzimáticos modificados con glutaraldehído fueron analizadas.

4.7 Propiedades de los diferentes derivados enzimáticos.

4.7.1. Estabilidad térmica.

Los diferentes derivados enzimáticos de las distintas enzimas se incubaron a diferentes temperaturas en condiciones de pH, fuerza iónica y concentración que se detallan en los pies de figura en cada caso. Periódicamente, se tomaron muestras de las suspensiones y se midió la actividad enzimática residual como se describió previamente para cada una de las enzimas en 4.2.

Los factores de estabilización se calcularon mediante el cociente entre la vida media de cada uno de los derivados y la vida media de la enzima soluble, medidas ambas en las mismas condiciones de inactivación. Las vidas medias se calcularon ajustando los datos experimentales a una ecuación que describe un mecanismo de inactivación de dos fases en serie (Henley y col., 1984; Illanes y col., 1996), utilizando el programa computacional *SPSS*, considerando un coeficiente de

correlación mayor de 0,9. El modelo matemático en el que se basa este mecanismo fue dado por la **Ecuación 2:**

$$\frac{e}{e_0} = \left[1 + A \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) - \left[A \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde e fue la actividad residual en el tiempo t , e_0 fue la actividad enzimática inicial, t fue tiempo, k_1 y k_2 fueron las constantes de inactivación de cada una de las etapas de inactivación y A representó el cociente entre la actividad de la especie enzimática intermedia y la inicial

4.7.2. Capacidad de carga enzimática de diferentes derivados.

Se estudió la capacidad de carga de los soportes Sepabeads EC-HFA y Sepabeads PEI con GAC. Los experimentos se llevaron a cabo ofreciendo diferentes cantidades de GAC (20, 40, 60, 80, 100 y 120 UI/mL) a un gramo de ambos soportes en 5 mL de fosfato de sodio 5 mM, a pH 7 y 25° C, bajo agitación suave. La cantidad de enzima unida a cada uno de los soportes fue determinada como la diferencia entre la actividad del sobrenadante al inicio de la inmovilización y la actividad residual del sobrenadante al final de la inmovilización.

4.7.3. Resistencia mecánica de diferentes derivados.

La resistencia mecánica se analizó, estudiando dos sistemas de agitación 1) agitación magnética y 2) agitación con palas giratorias.

- 1) Se llevo a cabo preparando una suspensión 1/30 (gramos de derivado/volumen total) en fosfato de sodio 25 mM, pH 7 25° C de diferentes derivados con alta carga enzimática (más de 50 mg GAC/ g soporte). Estas suspensiones fueron albergadas en una cubeta espectrofotométrica bajo agitación magnética, midiendo el incremento de absorbancia con el tiempo a 540 nm . Este incremento nos da una idea de la resistencia mecánica de los derivados, debido a que la formación de partículas de menor tamaño provoca un aumento de la absorbancia a esta longitud de onda.

2) Se llevo a cabo con diferentes derivados enzimáticos, que como en el caso anterior deben estar muy cargados de enzima (más de 50 mg GAC/ g soporte), sin embargo en este caso se preparo una suspensión 1/10 (gramos de derivado/volumen total) de cada uno de los derivados en fosfato de sodio 25 mM, pH 7 y 4° C. Estas suspensiones se incubaron bajo agitación con palas giratorias durante 24 h en las condiciones anteriormente descritas, la ruptura del derivado por agitación se puso de manifiesto por el aumento de actividad en la suspensión debido a la formación de partículas de menor tamaño que presentan menos problemas de difusión expresando una mayor actividad.

4.7.4. Constantes cinéticas de GAC con GL-7-ACA y α -cetoadipil 7-ACA como sustratos.

La constante de Michaelis-Menten (K_m), la constante catalítica (K_{cat}) y la eficiencia catalítica (K_m/K_{cat}) fueron determinadas con estos sustratos para las preparaciones solubles de GAC nativa y de diferentes mutantes de esta. Estos parámetros también fueron calculados para los derivados de GAC nativa y mutantes de esta, adsorbidos iónicamente en agarosa-PEI y entrecruzados con glutaraldehído. Las hidrólisis de GL-7-ACA y α -cetoadipil 7-ACA con las preparaciones solubles fueron determinadas mediante el ensayo colorimétrico descrito en el apartado 4.2, 2). Se usaron diferentes concentraciones de ambos sustratos, para GL-7-ACA fueron usadas concentraciones entre 0.005-0.5 mM y para α -cetoadipil 7-ACA se usaron concentraciones entre 0.02-6.25 mM. . Cada valor de actividad fue medido por triplicado. En el caso de los derivados inmovilizados se usaron las mismas concentraciones de sustratos que para las preparaciones solubles, sin embargo el análisis de actividad fue llevado a cabo via HPLC como fue descrito en el apartado 4.2, 3). Los parámetros cinéticos fueron obtenidos ajustando los datos experimentales a curvas de Lineweaver-Burk. La K_{cat} fue calculada usando el peso molecular teórico de GAC madura, 75,9 kDa.

4.7.5. Inhibición de distintos ácidos en la actividad hidrolasa de GAC hacia diferentes sustratos.

Los experimentos de inhibición fueron llevados a cabo con diferentes preparaciones de GAC inmovilizadas en agarosa-PEI. Estos derivados fueron posteriormente entrecruzados con glutaraldehído. Todas las actividades fueron determinadas *via* HPLC como fue descrito en el

apartado 4.2, 3). La inhibiciones del ácido glutárico y del ácido adípico sobre las actividades GL-7-ACA y α -cetoadipil 7-ACA acilasas fueron llevadas a cabo preparando una mezcla de reacción con 10 mM de GL-7ACA ó con 13.8 mM de α -cetoadipil 7-ACA y diferentes concentraciones de ácido glutárico (0-50mM). En el caso de la actividad α -cetoadipil 7-ACA acilasa también fue estudiada la inhibición de esta actividad por el ácido adípico a diferentes concentraciones (0-20 mM).

4.8 Modificación de la superficie de GAC mediante aminación química.

La aminación química fue llevada a cabo sobre preparaciones solubles e inmovilizadas (en agarosa activada con grupos glioxiles(Gx-agarosa)) de GAC. Esta modificación química fue realizada con diferentes concentraciones de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDAC) en presencia de 1 M de etilendiamina (EDA) a diferentes valores de pH (Hoare y Koshland, 1967) para controlar el grado de modificación.

4.8.1. Aminación de las preparaciones inmovilizadas de GAC.

Se incubó 1g de derivado enzimático de GAC con 49 mL de EDA 1M a pH 6. Diferentes cantidades de EDAC en su forma sólida fueron añadidas a la suspensión previamente preparada, de modo que la concentración final de EDAC en esta suspensión fuese 10^{-2} o 10^{-3} M. Después de 90 minutos bajo agitación suave y a 25°C, esta suspensión fue filtrada e incubada durante 4h con 0.1 M de hidroxilamina a pH 7, para recuperar las tirosinas que pudieran haber sido modificadas por la EDAC (Carraway y col., 1968). Una vez transcurridas las 4h, el derivado fue filtrado y lavado con un exceso de agua destilada y finalmente con fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5. Estos derivados enzimáticos fueron almacenados a 4°C.

Las enzimas inmovilizadas en Gx-agarosa y posteriormente aminadas se nombraron como: iGAC 6-2 (GAC inmovilizada en Gx-agarosa y posteriormente modificada con 10^{-2} de EDAC), iGAC 6-3(GAC inmovilizada en Gx-agarosa y posteriormente modificada con 10^{-3} de EDAC).

4.8.2. Aminación de la preparación soluble de GAC.

Se incubaron 5 mL de GAC soluble (11 mg/mL) con 45 mL de EDA 1M a pH6. EDAC en su forma sólida fue añadida de modo que la concentración de la solución final fuese 10^{-2} M o 10^{-3} . Después de 90 minutos bajo agitación suave y a 25° C, fueron añadidos 10 mL de una solución de

hidroxilamina 0.5 M a pH 7, con el objetivo de recuperar las tirosinas superficiales del enzima modificadas por la EDAC. Esta solución se dejó reaccionar durante 4h. Después de este proceso la solución fue dializada 5 veces frente a 50 volúmenes de fosfato de sodio 25 mM pH 7.5, para eliminar el exceso de EDA e hidroxilamina. Una vez llevada a cabo la diálisis, la preparación soluble y aminada de GAC pudo ser almacenada a 4°C. Durante todo el proceso de aminación, se tomaron muestras y la actividad de estas fue analizada como se describe en 4.2,1). Las enzimas aminadas en estas dos condiciones pasaron a denominarse GAC 6-2(aminada a pH 6 y 10^{-2} M de EDAC y 1 M de EDA) y GAC 6-3 (aminada a pH 6 y 10^{-3} M de EDAC y 1 M de EDA)

4.9 Preparación de agregados enzimáticos de GAC.

4.9.1 Preparación de agregados enzimáticos precipitados con polietilenglicol (PEG) y entrecruzados con glutaraldehído (CLEA-PEG).

Estos agregados enzimáticos fueron preparados añadiendo 25 mL de PEG con un peso molecular de 600 Da bajo agitación fuerte a 10 mL de una solución de GAC (25 mg/mL). La mezcla fue incubada en estas condiciones durante 10 minutos. Después otros 35 mL de PEG del mismo peso molecular fueron añadidos a esta solución. Se dejó que se formaran los agregados enzimáticos durante 30 minutos más. Después, se añadieron 2.1 mL de una solución de glutaraldehído 25% (v/v) para entrecruzar el precipitado enzimático, esta reacción de entrecruzamiento se llevo bajo agitación fuerte durante 1h. Después el volumen de esta suspensión fue duplicado con bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10. A esta solución le fueron añadidos 144 mg de borohidruro de sodio (NaBH_4) para reducir los enlaces formados entre el glutaraldehído y los aminos primarios de la enzima, este proceso de reducción se dio durante 15 minutos. Después, se añadieron otros 144 mg más de borohidruro de sodio, dejando otros 15 minutos de reacción. Finalmente este agregado enzimático (CLEA-PEG) fue lavado varias veces con fosfato de sodio 100 mM a pH 7 y sometido a centrifugaciones de 15 minutos a 12000 rpm. Todos estos ensayos se llevaron en un baño de agua, manteniendo constante la temperatura a 10° C.

4.9.2 Preparación de agregados enzimáticos co-precipitados con PEI en presencia de polietilenglicol (PEG) y entrecruzados con glutaraldehído (CLEA-PEIPEG).

El protocolo de preparación de estos agregados enzimáticos fue muy

similar al descrito en el punto 4.9.1. Sin embargo, en este caso, la solución enzimática de GAC (25 mg/mL) fue mezclada, antes de añadir el PEG, bajo agitación con una solución de Polietilenimina (PEI) (100 mg/mL) a pH 7 en una relación 1:1 (mg de proteína: mg de PEI). Después de esto, se añadió glutaraldehído al 25% (v/v) hasta una concentración final de 75 mM en la suspensión, esta se dejó bajo fuerte agitación 10 minutos para que el glutaraldehído reaccionara con la enzima y la PEI. Después de esto, se añadieron 60 mL de PEG (600 Da) bajo agitación fuerte. Finalmente este agregado proteico (CLEA-PEIPEG) fue reducido y lavado como previamente fue descrito en 4.9.1.

4.9.3 Preparación de agregados enzimáticos precipitados con PEI y entrecruzados con glutaraldehído (CLEA-PEI).

Estos agregados fueron preparados exactamente igual que en el punto 4.9.2, salvo que el PEG no fue añadido después de añadir el glutaraldehído. El entrecruzamiento, la reducción y los lavados se llevaron como fue previamente descrito en 4.9.1. Este agregado es posible porque la PEI favorece la precipitación de GAC.

4.10 Estudio de la cantidad de agua en el interior de los diferentes agregados enzimáticos.

Después de recuperar los diferentes agregados enzimáticos por centrifugación estos fueron secados a vacío a una temperatura de 70° C, estas muestras fueron pesadas a diferentes tiempos hasta que mantuvieron el peso constante. El peso de agua en el interior se calculó como la diferencia entre el peso de la forma inicial húmeda y el peso de la forma final totalmente seca.

4.11 Conversión de CFC a 7-ACA en dos reactores (Proceso en 2 pasos).

1er breactor: Conversión de CFC a GL-7-ACA o α -cetoadipil 7-ACA: 0,2g de DAAO inmovilizada en Gx-agarosa (ver 4.5.1) o DAAO co-inmovilizada con CATb en Gx-agarosa en una relación 1:10 mg DAAO:mg CATb según el protocolo descrito en Betancor, 2005, fueron añadidos a 4 mL de CPC 40 mM en fosfato de potasio a pH 7.5 y 25° C bajo agitación mecánica, para llevar a cabo la deaminación oxidativa de CPC a GL-7-ACA y α -cetoadipil 7-ACA, respectivamente. A diferentes tiempos se tomaron muestras de los sobrenadantes de estas suspensiones y fueron analizados

mediante HPLC. Cuando se llegó a la conversión total de CPC, la suspensión fue filtrada y el sobrenadante recuperado para posteriores ensayos.

Condiciones de HPLC: Estos productos fueron determinados por HPLC usando una columna Kromasil C8 (5 μ m, 250x4.6 mm), la fase móvil fue una mezcla isocrática de acetato amónico 20 mM y acetonitrilo a pH 5.2, en una proporción volumétrica 95:5. Los compuestos fueron determinados a una longitud de onda de 254 nm con unos tiempos de retención, a flujo de 1.5 mL/min de 4.1, 4.9, 6.7 y 12.3 min para la CPC, el 7-ACA, el α -cetoadipil 7-ACA y el GL-7-ACA respectivamente. Otros picos minoritarios fueron considerados como productos laterales.

2nd reactor. Conversión de GL-7-ACA o α -cetoadipil 7-ACA a 7-ACA. Los 4 mL de GL-7-ACA o α -cetoadipil 7-ACA obtenidos en el proceso anterior, fueron incubados con 1.5 g de un derivado de GAC adsorbida por intercambio iónico en agarosa-PEI, (25 mg GAC/g soporte) posteriormente entrecruzados con glutaraldehído y el pH de la suspensión fue subido hasta un valor de 8. Esta suspensión se incubó bajo agitación y el pH se mantuvo constante durante toda la reacción mediante adiciones continuas de hidróxido sódico 4 M. A diferentes tiempos se tomaron muestras de sobrenadante, y estas fueron analizadas por HPLC en las mismas condiciones que se detallaron para la reacción del 1^{er} reactor.

4.12 Conversión directa de CPC a 7-ACA en un solo reactor (Proceso en un solo paso).

El derivado co-inmovilizado que presentó mejores propiedades para la eliminación *in situ* del peróxido de hidrógeno fue elegido para llevar a cabo este proceso (Betancor, 2005). 0.2 g de este derivado co-inmovilizado DAAO-CATb (2mg DAAO:20 mg CATb/ g soporte) en Gx-agarosa fueron incubados con 4 mL de una solución de CPC 40 mM en fosfato de potasio 0.1 M a pH 8 y 25° C. La suspensión fue mecánicamente agitada y el pH se mantuvo constante en un valor de 8 mediante adiciones sucesivas de hidróxido de sodio 4 M. Se tomaron muestras del sobrenadante a diferentes tiempos y estas fueron analizadas por HPLC en las condiciones descritas anteriormente para el proceso en dos pasos (4.11)

4.13 Síntesis Termodinámicamente Controlada (STC) de Cefazolina.

Para llevar a cabo las reacciones de síntesis de Cefazolina mediante STC, se siguió una estrategia de reacción dinámica previamente descrita por Fernández-Lafuente y col., 1996. Esta reacción se llevo a cabo con concentraciones variables de núcleo β -lactámico (7-ACA) y con concentraciones variables de ácido (ácido 2-tiofeno-acético) que serán detalladas en los pies de figura de cada uno de los experimentos. Se usaron dos tipos de 7-ACA, uno el proveniente de la reacción de producción en un solo paso previamente descrita (4.12) sin purificar y el otro purificado y cristalizado proveniente de la reacción en dos pasos (4.11). Por lo tanto, la mezcla de reacción consistió en una solución de 7-ACA y ácido en tampón fosfato de potasio 0.1 M y 50% de Bis-(2-metoxietil)eter (Diglime) a pH 7.2 como valor inicial de la reacción para que la solubilidad de los sustratos sea óptima a las concentraciones utilizadas. Esta mezcla de reacción se llevó a cabo en "batch" a 25° C una preparación inmovilizada de PGA con el objetivo de catalizar la reacción. Como el diseño de la reacción es mediante una estrategia dinámica, se disminuyo el pH del medio de reacción conforme se consumían los sustratos, para mejorar la termodinámica de la misma. Esto se logró mediante adiciones sucesivas de ácido clorhídrico (HCl) para bajar el pH hasta un valor de 6.2. Esta disminución del pH se hará de forma progresiva, al 25% de conversión el pH fue ajustado hasta 7.0, al 50% hasta 6.6 y al 75% hasta 6.2. A diferentes tiempos se tomaron muestras de sobrenadante que fueron analizadas mediante HPLC, en las condiciones que a continuación se detallan, para calcular el rendimiento de síntesis del antibiótico.

-Condiciones de HPLC. Estos productos fueron determinados por HPLC usando una columna Kromasil C18 (5 μ m, 125x4.6 mm), la fase móvil fue una mezcla isocrática de fosfato de sodio 67 mM y metanol a pH 4,7 en una proporción volumétrica de 70:30. Los picos fueron detectados a una longitud de onda de 254 nm con tiempos de retención, a flujo de 1.2 mL/ min, de 1.2, 3,6 y 9.5 min para el 7-ACA, el ácido tienilacético y la cefazolina, respectivamente. Otros picos minoritarios fueron considerados como productos laterales.

4.14 Síntesis cinéticamente controlada del ácido 7-[(1-hidroxi-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico, un precursor del Cefamandol.

Esta reacción se llevo a cabo con concentraciones variables de núcleo β -lactámico (7-ACA) purificado y cristalizado proveniente del proceso en dos pasos (4.11) ó sin purificar

directamente de la reacción de producción en un solo paso previamente descrita (4.12) y con concentraciones variables de éster (metil D(+) α -hidroxi-fenilacetato) (R-MAME)) que serán detalladas en los pies de figura de cada uno de los experimentos.

- *SCC en un sistema acuoso.* Las reacciones fueron llevadas a cabo en “batch”, donde la mezcla de reacción estaba formada por el éster y el núcleo β -lactámico disueltos en fosfato de sodio 10 mM a pH 6.5 y 25° C. Esta mezcla de reacción se incubó con 2 UE totales de diferentes derivados enzimáticos de PGA. Durante toda la reacción el pH fue mantenido constante en un valor de 6.5 mediante adiciones sucesivas de NaOH 4M. A diferentes tiempos se tomaron muestras del sobrenadante, que fueron analizadas mediante HPLC en las condiciones que a continuación se detallan,

Condiciones de HPLC: Estos productos fueron determinados por HPLC usando una columna Kromasil C18 (5 μ m, 125x4.6 mm), la fase móvil fue una mezcla isocrática de fosfato de amonio 20 mM y acetonitrilo a pH 3,2 en una proporción volumétrica de 80:20. Los picos fueron detectados a una longitud de onda de 210 nm con tiempos de retención, a flujo de 1.2 mL/ min, de 1.2, 3,1, 6 y 8 min para el 7-ACA, el α -hidroxi-feniacético (ácido mandélico), ácido 7-[(1-hidroxi-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico y el R-MAME, respectivamente. Otros picos minoritarios fueron considerados como productos laterales

-*SCC en un sistema bifásica.* Las reacciones fueron llevadas a cabo en “batch” en dos fases como fue descrito por Terreni y col., 2005b. La fase superior estaba compuesta por PEG de peso molecular de 600 Da al 80% y pH 6.5, la fase inferior estaba compuesta por sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 3M a pH 6.5. Los sustratos a diferentes concentraciones fueron disueltos en esta mezcla, distribuyéndose entre las dos fases en función de sus respectivos coeficientes de reparto (*K_c*). De este modo, a 4 mL de mezcla de reacción (2 mL de fase con PEG y 2 mL de fase con sulfato de amonio) se le añadieron 2 UE totales de diferentes derivados de PGA (previamente equilibrado con la fase de sulfato amónico 3M), durante toda la reacción se mantuvo constante el pH en un valor de 6.5 mediante adiciones sucesivas de NaOH 4M. A diferentes tiempos se tomaron muestras de sobrenadante de la fase superior e inferior y fueron analizadas mediante HPLC en las mismas condiciones previamente descritas para el sistema acuoso.

5. RESULTADOS

5.1 Estabilización de Glutaril acilasa (GAC) mediante diferentes técnicas físico-químicas.

Con el objetivo de obtener un biocatalizador muy robusto de GAC, se usaron diferentes técnicas físico-químicas, como la inmovilización sobre diferentes resinas sólidas utilizando diferentes químicas de unión enzima-soporte (López-Gallego y col, 2004, Alonso y col 2004 y Alonso y col 2005), la modificación química de la superficie proteica (López-Gallego y col 2005a) o la agregación de proteínas en presencia de diferentes agentes precipitantes (López-Gallego y col 2005b)

5.1.1. Estabilización de GAC mediante diferentes métodos de inmovilización.

GAC fue inmovilizada en diferentes soportes a través de diferentes químicas de unión entre la enzima y el soporte. En la Tabla 5.1 se muestran los rendimientos de inmovilización y las actividades intrínsecas después del proceso de inmovilización.

Tabla 5.1: Rendimiento de inmovilización y actividad expresada de GAC en diferentes soportes.

Estrategia de inmovilización	Rendimiento de inmovilización (%) ^a	Actividad intrínseca (%) ^b
Glioxil agarosa	100	45
Glutaraldehído agarosa	100	100
CNBr agarosa	100	100
Sepabeads EC-HFA	100	100
Sepabeads EC-EP	75	100

^a (Actividad de la suspensión control – actividad del sobrenadante/ Actividad de la suspensión control)

^b (Actividad expresada por el derivado después del proceso de inmovilización/ Actividad inmovilizada teniendo en cuenta ^a)

Todos los soportes inmovilizaron el 100% de la enzima ofrecida salvo el Sepabeads EC-EP (soporte monofuncional con grupos epóxido reactivos) que solo fue capaz de inmovilizar el 75% de la proteína ofrecida. La actividad expresada en la mayoría de los soportes fue superior al 60%, excepto cuando GAC fue inmovilizada en glioxil agarosa (Gx-agarosa) donde el derivado expresó el 45% de la actividad ofrecida habiéndose inmovilizado el 100%. Cuando se estudió el curso de inmovilización en Sepabeads EC-HFA (soporte heterofuncional con grupos epóxido reactivos y grupos aminos

cargados positivamente), más del 80% de la actividad ofrecida fue inmovilizada en la primera hora del proceso (Figura 5.1).

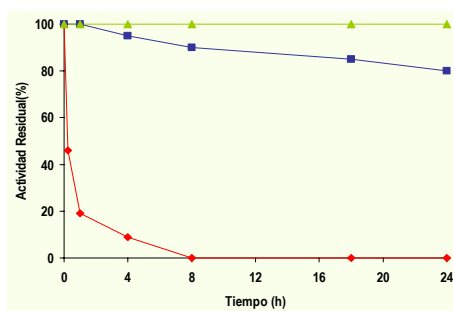


Figura 5.1 Curso de inmovilización de GAC en Sepabeads EC-HFA. (▲)Suspensión de referencia (●)Sobrenadante (■)Suspensión. La inmovilización fue llevada a cabo en 25 mM de fosfato de sodio a pH 7 y 25° C

-a) Estabilidad térmica de los diferentes derivados.

Se estudió la estabilidad térmica de estos derivados a 45° C con el objetivo de acelerar el proceso de inactivación, porque en las condiciones industriales (30-37°C) (Schröen y col, 2000) muchos de los derivados mantenían el 100% de la actividad inicial después de una semana. En la figura 5.2 se puede observar que en todos los casos, la inmovilización promovió una estabilización con respecto de la preparación soluble.

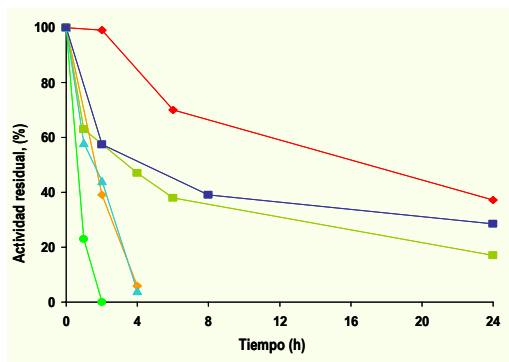


Figura 5.2 Curso de inactivación térmica de diferentes derivados inmovilizados de GAC. (▲) Sepabeads EC-HFA (■) Agarosa activada con glutaraldehído (▲) Sepabeads EC-EP (▲) Agarosa activada con bromuro de cianogeno (●) Agarosa activada con grupos glioxil (●) Enzima soluble. La inactivación térmica se llevo a cabo con una suspensión de 3UI/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

De todos los derivados ensayados, la preparación inmovilizada sobre Sepabeads EC-HFA (amino-epóxido) mostró la mayor estabilidad, con un descenso de solo el 30% en su actividad inicial después de 10 h a 45° C. Aunque no tan estables como este derivado, las preparaciones inmovilizadas sobre el soporte Sepabeads EC-EP (solo grupos epóxidos) y sobre agarosa activada

con glutaraldehído mostraron buenos resultados en términos de estabilidad térmica, presentando una vida media de 4h. En el resto de preparaciones inmovilizadas la actividad enzimática cayó más del 50 % después de las primeras dos horas de incubación a 45° C. En vista de estos resultados, la inmovilización sobre Sepabeads EC-HFA y sobre soportes activados con glutaraldehído mostraron las mejores perspectivas para ser optimizados con el objetivo de lograr un biocatalizador de GAC lo más estable posible.

-b) Optimización de la estabilidad del derivado de GAC inmovilizado en Sepabeads EC-HFA.

Debido a la baja reactividad de los grupos epóxido a pH 7, decidimos someter al derivado de GAC inmovilizado sobre Sepabeads EC-HFA, el cuál fue inmovilizado a pH 7, a una incubación a pH alcalino, previa al bloqueo final del soporte con glicina, para mejorar la reactividad entre los epóxidos del soporte y los grupos de la proteína capaces de reaccionar con dichos epóxidos. Sin embargo debido a la baja estabilidad de los epóxidos a pH alcalino llevaremos a cabo esta incubación a baja temperatura (4° C). De este modo, incubando el derivado a pH 10 y 4° C después de la inmovilización a pH 7 y 25°C se alcanzo una gran estabilización (Figura 5.3). Esta estabilización fue tanto mayor cuanto mayor fue el tiempo de incubación en estas condiciones, alcanzándose un máximo de estabilidad a los 7 días de incubación. Con este tiempo de incubación se logró un derivado inmovilizado 130 veces más estable que la preparación unipuntual inmovilizada en agarosa activada con CNBr y en torno a 250 veces más estable que la enzima soluble.

Se puede observar en la figura 5.3, como la incubación a pH 7 a lo largo de tiempo no condujo a un aumento de la estabilidad térmica de la preparación.

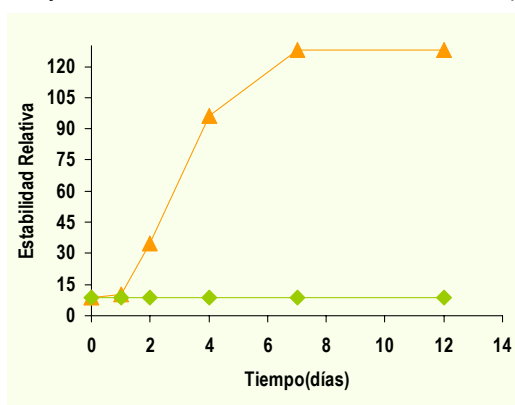


Figura 5.3 Efecto del pH de la incubación después de la inmovilización de GAC en Sepabeads EC-HFA en la estabilidad final del derivado.

(♦) GAC inmovilizada en Sepbeads EC-HFA y posteriormente incubada a pH 10 diferentes tiempos (▲) GAC inmovilizada en Sepbeads EC-HFA y posteriormente incubada a pH 7 diferentes tiempos. Las inactivaciones térmicas se llevaron a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C. Estabilidad relativa fue definida como el cociente entre la vida media de cada uno de los derivados y la vida media del derivado inmovilizado sobre agarosa activa con bromuro de cianogeno

-c) Optimización del entrecruzamiento con glutaraldehído de los derivados de GAC adsorbidos iónicamente en soportes cargados positivamente.

Como se pudo observar en la Figura 5.1 la inmovilización en soportes activados con glutaraldehído presentó buenas propiedades en términos de estabilidad térmica. Por esta razón se estudio más a fondo esta técnica de inmovilización. Además se conocía que la adsorción por intercambio iónico de la GAC en soportes cargados positivamente con aminos primarios (p.e. Sepabeads EC-EA o MANAE agarosa) era muy rápida y ocurría sin pérdida de actividad después de dicho proceso (Alonso y col., 2004).

Conociendo estos datos se estudiaron las diferentes estrategias para llevar a cabo la inmovilización covalente con glutaraldehído. Por un lado, GAC fue inmovilizada en un soporte Sepabeads EC-EA preactivado con glutaraldehído, presentando el 100% de inmovilización y un 90% de actividad expresada. De forma similar, un derivado donde GAC fue absorbida por intercambio iónico en Sepabeads EC-EA fue tratado *a posteriori* con una solución de glutaraldehído al 0.5%, expresando el 90% de la actividad inicial después del tratamiento.

Estos dos derivados enzimáticos fueron incubados en presencia de una solución de NaCl 1M, con el objetivo de desorber las moléculas de enzima que no hayan reaccionado covalentemente con el glutaraldehído, las cuales solo estaría unidas de forma reversible al soporte a través de interacciones iónicas. Como cabía esperar, el 100% de la actividad GAC adsorbida en el soporte Sepabeads EC-EA fue liberada al sobrenadante en presencia del NaCl. Sin embargo, en los casos del derivado inmovilizado sobre el soporte activado con glutaraldehído y del derivado entrecruzado con una solución de glutaraldehído al 0.5% no hubo desorción de actividad GAC al sobrenadante en presencia de NaCl. Estos resultados muestran que hubo al menos un enlace covalente entre el enzima y el soporte a través de la química del glutaraldehído.

Por otro lado, se estudió la estabilidad térmica de todas estas preparaciones inmovilizadas (Figura 5.4). Todas las preparaciones inmovilizadas fueron más estables que la enzima soluble.

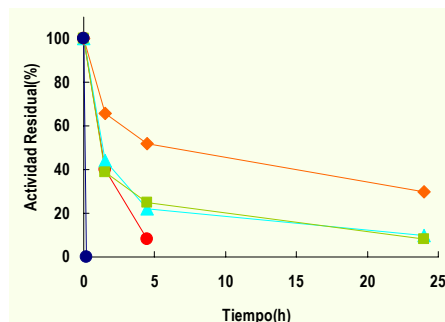


Figura 5.4 Curso de inactivación térmica de diferentes derivados de GAC inmovilizados covalentemente a través de glutaraldehído.

(♦) GAC adsorbida mediante intercambio iónico en Sepabeads EC-EA y posteriormente entrecruzada con una solución de glutaraldehído al 0.5% (■) GAC inmovilizada en Sepabeads EC-EA activado con glutaraldehído y posteriormente modificada con una solución de glutaraldehído 0.5% (▲) GAC inmovilizada en Sepabeads EC-EA activado con glutaraldehído, (●) GAC adsorbida por intercambio iónico en Sepabeads EC-EA (●) Enzima soluble. La inactivación térmica se llevó a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

Además, las preparaciones en las que se demostró que la interacción enzima-soporte era covalente presentaron una mayor estabilidad que la preparación donde la enzima solo estaba adsorbida iónicamente de forma reversible. Entre las preparaciones inmovilizadas covalentemente a través de la química del glutaraldehído, el tratamiento con dicho reactivo *a posteriori* de la adsorción iónica mostró mejores resultados que la inmovilización en soportes preactivados con éste. Además, se llevó a cabo un derivado control donde se trató con una solución de glutaraldehído al 0.5% a una preparación de GAC inmovilizada en Sepabeads EC-EA previamente activado con glutaraldehído en las mismas condiciones que el tratamiento de entrecruzamiento con glutaraldehído de GAC adsorbida iónicamente a Sepabeads EC-EA. Este control presentó la misma estabilidad que el derivado de GAC inmovilizado en Sepabeads EC-EA preactivado con glutaraldehído y sin tratamiento *a posteriori* con glutaraldehído. Por lo tanto, el aumento en estabilidad proporcionado por el tratamiento con glutaraldehído posterior a la adsorción iónica no fue debido a la modificación química de la superficie de la proteína, sino, muy posiblemente a la formación de un mayor número de interacciones enzima-soporte.

Debido a los buenos resultados obtenidos con esta nueva estrategia de inmovilización covalente y al potencial que presenta esta técnica para optimizar muchas de las variables implicadas en el proceso, se llevó a cabo el estudio de algunas de estas.

- **Tipo de Soporte:** Se estudió la estabilidad de la GAC adsorbida en Sepabeads EC-EA y en soportes recubiertos con PEI de diferentes tamaños. Se obtuvieron diferentes estabilizaciones en función del peso molecular de la PEI (Figura 5.5 A). Se pudo observar que la adsorción de la GAC sobre soportes recubiertos con PEI de peso molecular entre 25 y 600 KDa, consiguió unas estabilizaciones 4-5 veces mayores que las obtenidas cuando el enzima fue inmovilizado sobre un soporte recubierto con PEI de 0.7 KDa. Por otro lado, cuando todas estas preparaciones fueron

tratadas con una solución de glutaraldehído al 0.5%, la estabilidad de todas las preparaciones aumentó notablemente. Además, curiosamente todas las preparaciones iónicamente adsorbidas sobre los diferentes soportes y posteriormente entrecruzadas con glutaraldehído presentaron estabilidades muy similares (Figura 5.5B), siendo despreciable el efecto del tamaño de la PEI, el cual era muy importante en las preparaciones que no fueron tratadas con glutaraldehído.

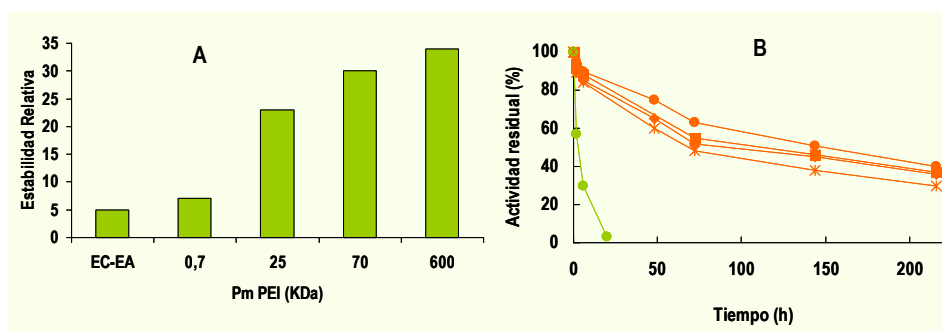


Figura 5.5.(A) Efecto del tamaño de la PEI en la estabilidad de la GAC. La estabilidad relativa fue definida como el cociente entre la vida media de los derivados y la vida media de la enzima soluble. **(B) Efecto del tamaño de la PEI en la eficiencia del tratamiento con glutaraldehído sobre GAC adsorbida a estos soportes.** (X) EC-EA, (■) 70 KDa, (◆) 25 KDa, (▲) 600 KDa, (●) 0.7 KDa, (●) 600KDa sin entrecruzar con glutaraldehído. Las inactivaciones térmicas se llevaron a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 y 45°C

- **Efecto de la concentración de glutaraldehído.** Se estudiaron diferentes concentraciones de la solución de glutaraldehído usada en el proceso de entrecruzamiento posterior a la adsorción iónica. La actividad enzimática no se vió muy afectada por la concentración de glutaraldehído durante el tratamiento (Figura 3.6). Se pudo observar que cuando el derivado de GAC adsorbida sobre Sepabeads-PEI 600 KDa fue tratado con concentraciones bajas de glutaraldehído, la actividad expresada por este derivado después del tratamiento fue menor que cuando el tratamiento fue llevado a cabo con concentraciones mayores de glutaraldehído, recuperándose en torno al 90% de la actividad inicial cuando la concentración de glutaraldehído fue entre 0.5 y el 2%.

Por otro lado, en términos de estabilidad se alcanzaron los mayores estabilizaciones cuando se emplearon soluciones de glutaraldehído a concentraciones entre 0.5 y el 0.65% (Figura 5.6). Por lo tanto, el protocolo óptimo para lograr un catalizador muy estable de GAC a través de la química del glutaraldehído pareció ser la adsorción de la enzima en un soporte recubierto con PEI de

peso molecular entre 25-600 KDa y posteriormente entrecruzado con una solución de glutaraldehído al 0.5%

- **Tiempo de entrecruzamiento después de la activación con glutaraldehído del soporte y la enzima.** Se estudiaron varios tiempos de incubación después de la reacción de activación con glutaraldehído que dura 1h. El derivado fue filtrado y lavado en las condiciones descritas en métodos. Este derivado filtrado y húmedo, ya activado con glutaraldehído, se dejó durante distintos tiempos (1, 5, 13 y 30 días) a 25° C, se analizo la estabilidad térmica de los diferentes derivados con distintos tiempos de incubación y se observo que las estabilidades eran exactamente las mismas (datos no mostrados). Por lo tanto, el tiempo de entrecruzamiento no tuvo efecto en la estabilidad térmica de los derivados.

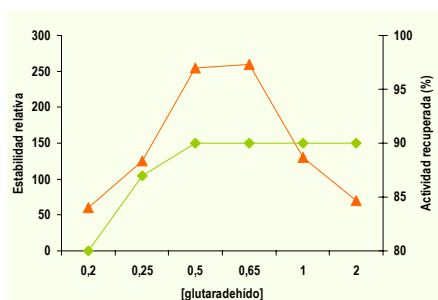


Figura 5.6 Efecto de la concentración de glutaraldehído durante el entrecruzamiento en la actividad y estabilidad de los derivados de GAC adsorbidos en agarosa cubierta con PEI 600. Las inactivaciones térmicas se llevaron a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C. Estabilidad relativa fue definida como el cociente entre la vida media de cada uno de los derivados y la vida media del la enzima soluble. (♦) Actividad (▲) Estabilidad relativa.

-d) *Caracterización y comparación de la propiedades de los diferentes biocatalizadores óptimos de GAC inmovilizada en Sepabeads EC-HFA y en PEI-Sepabeads entrecruzado con glutaraldehído.*

Se estudiaron diferentes parámetros muy importantes a la hora de evaluar un biocatalizador para su aplicación industrial.

Estabilidad térmica: Se compararon las estabilidades térmicas de los dos biocatalizadores optimizados anteriormente con el derivado comercial suministrado por Roche (empresa biotecnológica productora de enzimas y derivados de estas) (Figura 5.7).

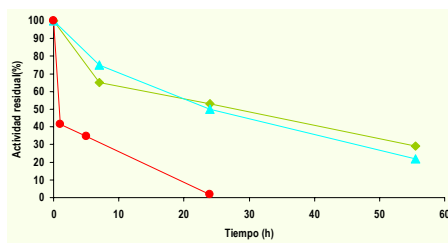


Figura 5.7 Curso de inactivación térmica de los derivados óptimos de GAC y el derivado comercial de GAC suministrado por Roche. (♦)GAC inmovilizado en Sepabeads EC-HFA e incubado 7 días a 4°C y pH 10 (▲) GAC adsorbido en Sepabeads EC-EP cubierto con PEI 600 y posteriormente entrecruzado con glutaraldehído 0.5% (●) Derivado comercial de Roche. La inactivación térmica se llevo a cabo con una suspensión de 3UI/mL iniciales en fosfato de sodio 25 Mm a pH 7.5 a 47°C

En la figura 5.7 se puede observar como las dos alternativas que hemos desarrollado para lograr un biocatalizador de GAC presentaron estabilidades muy similares, logrando estabilizaciones de entre 40 a 50 veces con respecto a la estabilidad mostrada por el derivado comercial suministrado por Roche a 47° C.

Capacidad de carga: Se estudió cuanta enzima eran capaces de inmovilizar los soportes Sepabeads EC-HFA y PEI 600KDa-Sepabeads por cada gramo de los mismos. En la Figura 5.8 se puede observar como en el soporte Sepabeads EC-HFA fue capaz de inmovilizar hasta 90 UI/g de soporte húmedo medidas a 25° C (esto supone unos 62 mg de proteína/ g soporte), de las cuales se recuperaron más del 90% después del tratamiento de optimización a pH 10 y 4°C durante 7 días, mostrando una actividad final de 85 UI/ g soporte. Por otro lado, el soporte Sepabeads-PEI 600 KDa fue capaz de inmovilizar hasta 50 UI/g de soporte húmedo medido a 25° C (35 mg de proteína/ g) (Figura 5.8) de las cuales se expresaron el 90% después del tratamiento óptimo con glutaraldehído mostrando una actividad final en torno a las 45 IU/g.

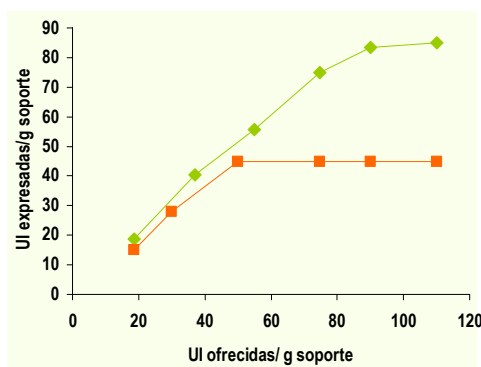


Figura 5.8. Capacidad de carga de las preparaciones inmovilizadas y optimizadas de GAC. Las condiciones de inmovilización se describen en Métodos 4.5.4 y 4.5.5 ofreciendo distintas cantidades de actividad enzimática. (♦) Derivado inmovilizado sobre Sepabeads EC-HFA (■) Derivado inmovilizado en Sepabeads EC-EP3 cubierto con PEI 600 KDa y posteriormente entrecruzado con glutaraldehído.

Como se puede observar el soporte Sepabeads EC-HFA es capaz de inmovilizar casi el doble de enzima que el soporte Sepabeads-PEI-600KDa, esto es lógico puesto que el primero posee un tamaño de poro más pequeño que el segundo, por lo que la superficie interna de este soporte es mucho más grande, pudiendo alojar una mayor cantidad de proteína.

Otro dato que cabe resaltar, es que el derivado comercial de Roche presentó una actividad de 83 UI/ g soporte húmedo a 25 °C frente a las 85 UI/g del derivado inmovilizado y estabilizado sobre Sepabeads EC-HFA en las mismas condiciones.

Resistencia mecánica: Otro parámetro muy importante para el uso de biocatalizadores a nivel industrial es su resistencia mecánica, puesto que serán sometidos a tiempos muy largos de agitación durante los diferentes ciclos de reacción. Por esta razón se estudió la estabilidad mecánica frente a dos tipos de agitación (magnética y con palas) de los dos mejores biocatalizadores desarrollados (GAC inmovilizada en Sepabeads EC-HFA y GAC adsorbida en Sepabeads-PEI 600 KDa y entrecruzada con glutaraldehído al 0.5%). La estabilidad mecánica de estos biocatalizadores fue comparada con la del derivado comercial suministrado por Roche.

Cuando los tres derivados fueron incubados bajo agitación magnética, se pudo observar que el derivado inmovilizado sobre Sepabeads-PEI-600KDa y entrecruzado con glutaraldehído tuvo una resistencia mecánica ligeramente mejor que el derivado comercial, siendo casi tres veces mayor el aumento de absorbancia con el tiempo en el caso del derivado comercial con respecto al derivado Sepabeads-PEI-600KDa. Este aumento de absorbancia en la cubeta fue debido a la formación de pequeñas partículas como consecuencia de la ruptura del soporte. Sin embargo, en el caso del derivado inmovilizado sobre el soporte Sepabeads EC-HFA apenas presentó un aumento de la absorbancia con el tiempo (Figura 5.9 A). Estos datos se tradujeron en una mayor resistencia mecánica del soporte Sepabeads EC-HFA frente al soporte PEI-600KDa-Sepabeads y frente al soporte del preparado comercial.

El mismo resultado se observó cuando los derivados se incubaron bajo agitación con palas rotatorias, en este caso, el indicativo de la ruptura de la estructura del soporte fue el aumento de la actividad de las suspensiones, debido a la formación de pequeños fragmentos de soporte con menores problemas de difusión, lo que provocó un aumento de la actividad observada. Se observó que todos los derivados eran más resistentes a la agitación con palas que a la agitación magnética, puesto que se observa una menor cantidad de finos bajo condiciones de agitación con palas. Aun así, en la Figura 5.9 B se puede observar como el soporte Sepabeads EC-HFA volvió a ser mucho más resistente que los otros dos, los cuales presentaron una resistencia mecánica muy parecida.

Por lo tanto no solo se han logrado dos estrategias de inmovilización-estabilización que han dado lugar a dos biocatalizadores mucho más estables que el derivado comercial, sino que además el biocatalizador inmovilizado-estabilizado sobre Sepabeads EC-HFA presenta una actividad similar a la del derivado comercial y con una resistencia mecánica mucho mayor.

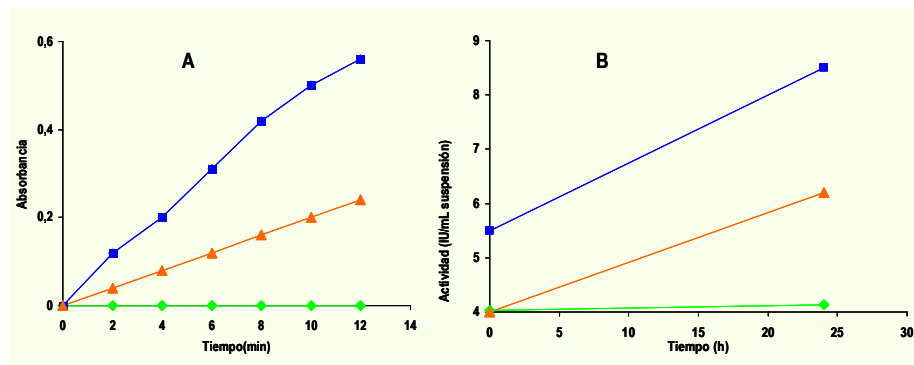


Figura 5.9. Resistencia mecánica de los mejores biocatalizadores de GAC y el biocatalizador comercial. (■) Derivado de GAC comercial suministrado por Roche (▲) GAC adsorbida en Sepabeads EC-EP cubierto con PEI 600KDa y entrecruzada con glutaraldehído 0.5% (◆) GAC inmovilizado-estabilizado en Sepabeads EC-HFA. (A) Agitación magnética (B) Agitación con palas giratorias. En ambos casos las suspensiones fueron preparadas con fosfato de sodio 25 mM pH 7 bajo su respectiva agitación a 4°C.

5.1.2. Mejora de la inmovilización-estabilización de GAC en soportes glioxil agarosa (Gx-agarosa)

Como pudo ser observado en el punto anterior (5.1.1), la GAC presentó muy malas perspectivas para su estabilización mediante la inmovilización covalente en soportes Gx-agarosa. Por esta razón se propuso el aumento en el número de grupos amino reactivos en la superficie del enzima *via* modificación química, con el objetivo de aumentar las posibilidades de interacción entre el enzima y el soporte.

-a) Aumento del número de lisinas en la superficie de GAC mediante modificación química.

La modificación química de la superficie proteica puede tener efectos sobre la actividad y/o la estabilidad enzimática. Para nuestros propósitos lo más conveniente fue tener el mayor grado de modificación superficial posible con el menor efecto en la actividad/estabilidad de la enzima modificada.

Se ha descrito que el pH óptimo para llevar a cabo la aminación química es 4.75 para la PGA, un enzima muy similar a GAC (Fernández-Lafuente y col., 1996; López-Gallego y col., 2005). El problema surgió cuando la GAC se inactivaba totalmente, imposibilitando su modificación química en estas condiciones. Por lo tanto se decidió llevar a cabo los posteriores ensayos de aminación química a pH 6, donde la estabilidad del enzima no se veía tan afectada. El problema de estas

condiciones de pH residió en que la EDAC, necesaria para activar los carboxilos superficiales, se descomponía más fácilmente. De este modo se llevó a cabo la aminación en fase sólida a pH 6 con 10 mM y 1 mM de EDAC.

Para observar el efecto de la modificación química sobre la actividad/estabilidad de la enzima, evitando posibles artefactos de agregación proteica de las enzimas modificadas en solución, se llevó a cabo la modificación química sobre enzimas previamente inmovilizadas. Estos tratamientos provocaron una pérdida del 20% de la actividad de los derivados inmovilizados antes de la modificación (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Efecto de la aminación en la actividad enzimática de diferentes preparaciones.

Preparación enzimática	Modificación química (Ver Métodos 2.8.2)	Perdida de actividad (%)*
GAC inmovilizada	6-2	20
GAC inmovilizada	6-3	20
GAC soluble	6-3	30

La modificación química de GAC fue llevada a cabo a pH 6. Para más detalles ver Métodos 4.8.2.

* (Actividad después de la modificación/ Actividad antes de la modificación) x100

Cuando se analizó el efecto de la modificación química en la estabilidad de la GAC (Figura 5.10), se pudo observar que las estabildades de los derivados sometidos a las modificaciones químicas (iGAC 6-2 y iGAC 6-3) y del derivado no modificado eran prácticamente iguales. Por lo tanto la modificación a pH 6, tanto con 10 mM como con 1 mM de EDAC y 1M de EDA no supuso ningún efecto en la estabilidad enzimática. De este modo, estas dos condiciones de aminación fueron elegidas para llevar a cabo la modificación de la enzima soluble. La aminación de la preparación soluble de GAC se llevo a cabo con una pérdida de actividad del 33% cuando la modificación se llevo a cabo con ambas concentraciones de EDAC, 10 y 10 mM, y 1M de EDA a pH 6 (Tabla 5.2)

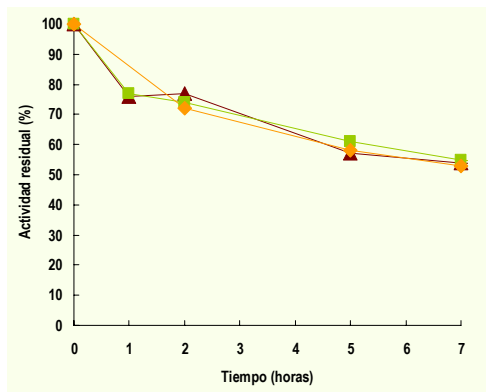


Figura 5.10 Curso de inactivación térmica de GAC inmovilizada en Gx-agarosa y posteriormente aminada químicamente. (▲) GAC inmovilizada en Gx-agarosa (■) iGAC 6-2 (●) iGAC 6-3. La inactivación térmica se llevó a cabo con una suspensión de 3 UI/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

-b) Inmovilización de las enzimas aminadas en Gx-agarosa a pH 10.

La enzima no aminada se inmovilizó muy lentamente en los soportes Gx-agarosa (50 % de inmovilización después de 4h) (Figura 5.11A), mientras que la enzima aminada (GAC 6-2) fue totalmente inmovilizada después de 1h en contacto con el soporte. (Figura 5.11B).

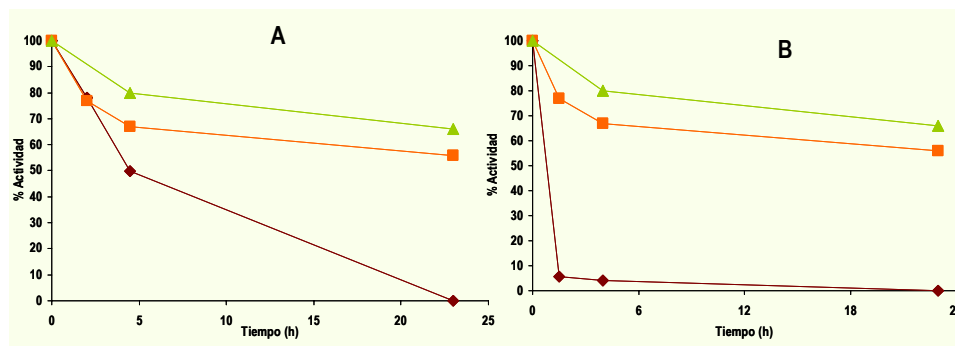


Figura 5.11 Curso de inmovilización de GAC no modificada (A) y GAC 6-2 (B) en Gx-agarosa. (▲) Suspensión de referencia (♦) Sobrenadante (■) Suspensión. La inmovilización fue llevada a cabo en 0.1 M de bicarbonato de sodio a pH 10 a 25°C

Por el contrario, la enzima aminada GAC 6-3 se comportó exactamente igual que la enzima no modificada, por lo que, en estas condiciones, el grado de aminación debió de ser casi despreciable (datos no mostrados). La inmovilización produjo un descenso en la actividad de las preparaciones insolubles del 50 y 40% para la enzima no aminada y aminada, respectivamente. En ambos casos, las preparaciones inmovilizadas fueron incubadas a pH 10 durante 24 h para mejorar la

estabilidad de éstas (Alvaro y col., 1990), favoreciendo la unión covalente multipuntual entre la enzima y el soporte.

-c) Estabilidad de los derivados de GAC 6-2 inmovilizada en Gx-agarosa.

Cuando GAC no modificada fue inmovilizada y estabilizada en Gx-agarosa, se logró un factor de estabilización de 29 con respecto de la enzima soluble. Sin embargo cuando la enzima GAC aminada (GAC 6-2) fue inmovilizada y estabilizada sobre Gx-agarosa, la preparación insoluble fue 7 veces más estable que GAC sin modificar inmovilizada en el mismo soporte (Figura 5.12).

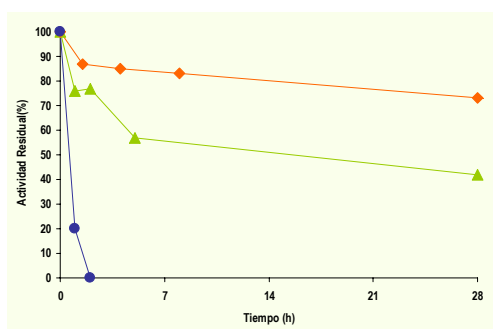


Figura 5.12 Curso de inactivación térmica de diferentes derivados de GAC inmovilizados en Gx-agarosa y de la enzima soluble.

(▲) GAC inmovilizada en Gx-agarosa. (♦) GAC 6-2 inmovilizada en Gx-agarosa. (●) Enzima soluble. La inactivación térmica se llevó a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

Por lo tanto, ni la modificación química de la GAC ni la inmovilización covalente, por si solas, consiguieron una gran mejora de la estabilidad enzimática. Sin embargo, cuando estas estrategias se usaron de manera combinada, se logró una preparación inmovilizada de la enzima modificada 200 veces más estable que la enzima soluble.

5.1.3. Mejora de la actividad/estabilidad de biocatalizadores de GAC mediante la co-agregación con polímeros aminados.

Los agregados enzimáticos (CLEAs) pueden usarse como biocatalizadores con la ventaja de que todo el catalizador es proteína puesto que no tenemos soporte, por lo que la actividad volumétrica de los mismo debe ser muy alta.

a) Agregados enzimáticos (CLEAs) de GAC con un polímero aminado.

Se prepararon diferentes agregados de GAC en presencia y ausencia de un polímero aminado como es el caso de la polietilenimina (PEI). En la Tabla 5.3 se observa que cuando no se usó la PEI como agente co-agregante (CLEA-PEG), el 20% de la proteína ofrecida se quedó sin

agregar, por lo tanto el PEG por si solo no es capaz de precipitar el 100% de la proteína soluble. Por otro lado cuando GAC soluble se puso en contacto con una solución de PEI ocurrió una precipitación espontánea de GAC, precipitando alrededor del 80% de la proteína soluble (CLEA-PEI) (Tabla 5.3). Solo cuando el PEG fue usado como agente precipitante en presencia una mezcla de GAC y PEI se consiguió la agregación del 100% de la proteína soluble (Tabla 3.3).

Tabla 5.3. Actividad y cantidad de agua de diferentes agregados proteicos de GAC.

Biocatalizador	Rendimiento de inmovilización (%)*	Actividad expresada (%)**	UI/ g seco***	Peso húmedo/ Peso seco
CLEA-PEG	80	14	62	1.84
CLEA-PEI	80	58	1273	11.6
CLEA-PEIPEG	100	57	341	8.8

*100-(Actividad total del sobrenadante después de la agregación/Actividad ofrecida) x 100

** (Actividad expresada después de la agregación/ Actividad teórica que fue agregada según el rendimiento de inmovilización) x 100

*** Los agregados se secaron según Métodos 2.10

Por otro lado, los agregados proteicos con PEI permitieron recuperar el 60% de la actividad ofrecida (Tabla 5.3). Esta pérdida moderada de actividad puede ser debida a los problemas de difusión (Shchoevaart y col., 2004). Sin embargo, el agregado proteico sin PEI (CLEA-PEG), solo expresó el 14% de la actividad inicialmente ofrecida (Tabla 5.3). Esta baja actividad expresada podría ser explicada por problemas difusionales. Sin embargo, cuando se llevo a cabo un análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes de los sobrenadantes de las suspensiones (Ver métodos 4.3) de los diferentes agregados (Figura 5.13), se pudo observar como el CLEA-PEG liberó moléculas de GAC al sobrenadante, apareciendo dos bandas de 49 y19 KDa correspondientes a cada una de las subunidades α y β de GAC (Figura 5.13). Sin embargo todas las moléculas de GAC se mantuvieron agregadas bajo este mismo tratamiento para el caso del CLEA-PEIPEG (no fueron detectadas bandas proteicas ni con tinción de plata). Por lo que la baja actividad expresada del CLEA-PEG es debida a la perdida de moléculas de enzima durante los proceso de lavado.

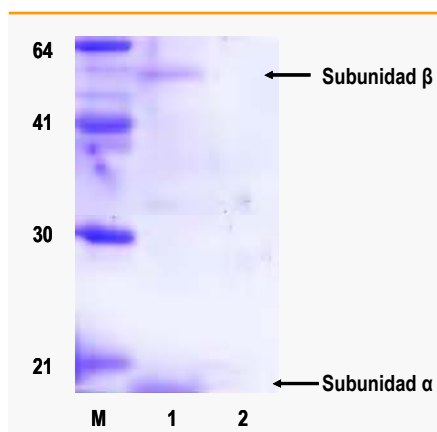


Figura 5.13. Análisis electroforético SDS-PAGE de la enzima liberada de diferentes agregados proteicos. Los agregados fueron resuspendidos en tampón de desnaturalización como se describe en Métodos 4.3. M: Marcadores de peso molecular. 1. CLEA-PEG y 2. CLEA-PEIPEG

b) Efecto de diferentes variables en la estabilidad de los agregados de GAC.

Se han estudiado diferentes parámetros importantes, como la presencia de polímero aminado y polietilenglicol (PEG) ó el tratamiento con glutaraldehído en la preparación de estos agregados enzimáticos para lograr que estos sean lo más estables posible.

Efecto de la polietilenimina (PEI): La inmovilización de GAC usando el protocolo más sencillo para preparar estos agregados proteicos (CLEA-PEG), no fue capaz de mejorar la estabilidad con respecto de la enzima soluble (Figura 3.14). Sin embargo, el mismo agregado proteico preparado en presencia de PEI (CLEA-PEI-PEG) mostró un importante incremento en la estabilidad del mismo (33 veces más estable que el enzima soluble).

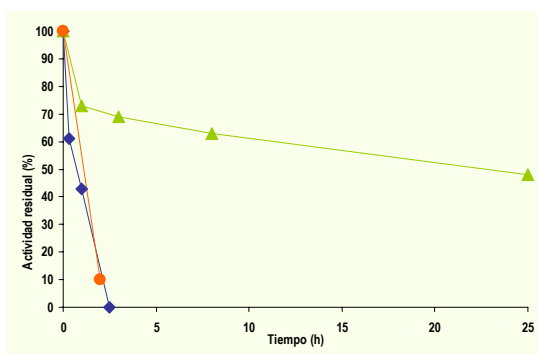


Figura 5.14 Curso de inactivación térmica de diferentes agregados de GAC. (▲) CLEA-PEIPEG (◆) CLEA-PEG (●) Enzima soluble. La inactivación térmica se llevo a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

Efecto del PEG durante la agregación proteica. La primera diferencia observada entre los agregados con PEG y sin él, fue el aspecto. Los agregados con PEG tenían un aspecto más

denso que los preparados sólo con PEI. Además, el agregado CLEA-PEIPEG mostró una relación peso húmedo /peso seco menor que el CLEA-PEI (Tabla 5.3), implicando una mayor hidratación de este último agregado. Otro aspecto importante es que el CLEA-PEIPEG tuvo menor actividad por gramo seco de agregado que el CLEA-PEI. Sin embargo, la actividad expresada en % fue muy similar entre ambos agregados, debido a que se recuperó casi 3 veces más masa de biocatalizador del CLEA-PEIPEG que del CLEA-PEI (Tabla 5.3).

Sin embargo la diferencia más interesante entre los dos tipos de agregados residió en sus respectivas estabildades térmicas (Figura 3.15). El CLEA-PEIPEG se mostró más estable que el CLEA-PEI, por lo tanto parece ser que un protocolo para la agregación de GAC con PEI y PEG sería más ventajoso, principalmente en términos de estabilidad térmica.

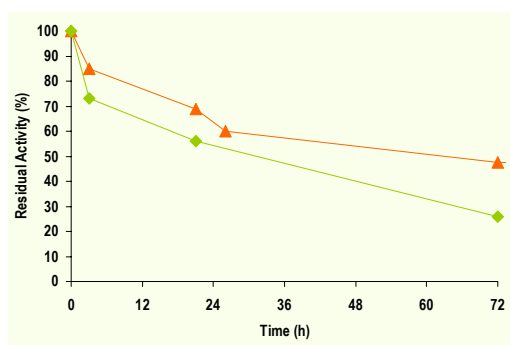


Figura 5.15 Curso de inactivación térmica de diferentes agregados de GAC.

(▲) CLEA- PEIPEG (◆) CLEA-PEI. La inactivación térmica se llevo a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

Optimización del tratamiento con glutaraldehído. El entrecruzamiento químico con glutaraldehído de los agregados proteicos puede ser llevado a cabo antes, durante o después de la precipitación (Lopez-Serrano y col., 2002). En este estudio se probó añadir el glutaraldehído en diferentes etapas del proceso de precipitación, los mejores resultados en términos de estabilidad fueron obtenidos cuando el agente entrecruzante, en este caso el glutaraldehído, fue añadido antes de la adición del agente precipitante (PEG) (Figura 5.16). Por otro lado el tiempo de entrecruzamiento no tuvo efecto en la estabilidad final de los agregados con PEI y PEG (CLEA-PEIPEG). Esto fue puesto de manifiesto cuando se redujo un agregado 1h después de la adición de glutaraldehído y otro a las 24h de la adición del agente entrecruzante, ambos agregados presentaron la misma estabilidad térmica (datos no mostrados).

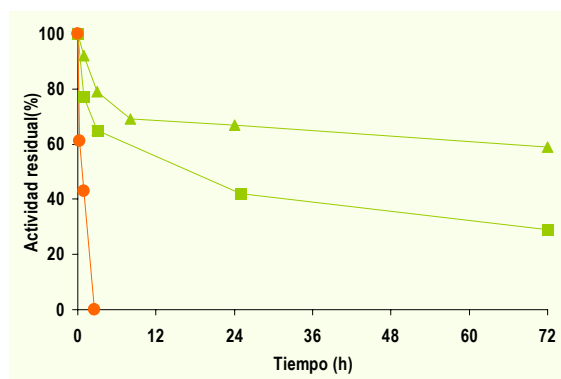


Figura 5.16 Curso de inactivación térmica de diferentes agregados de GAC. (▲) CLEA-PEIPEG añadiendo el glutaraldehído después de la PEI y antes del PEG (■) CLEA-PEIPEG añadiendo el glutaraldehído después de la PEI y el PEG (●) Enzima soluble. La inactivación térmica se llevo a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

Por lo tanto el protocolo óptimo para la preparación de agregados de GAC parece consistir en un primer paso de co-agregación entre la GAC y la PEI, posteriormente se llevará a cabo la adición del reactivo entrecruzante, en este caso el glutaraldehído, para después añadir el agente precipitante, esta mezcla se dejó bajo agitación a 10° C durante 1h para posteriormente ser reducida con borohidruro de sodio.

c) *Estabilidad térmica del CLEA-PEIPEG óptimo de GAC en comparación con los derivados inmovilizados de GAC en soportes sólidos.*

Debido al carácter estabilizante de la PEI sobre esta enzima (Alonso y col., 2004), fue interesante comparar la estabilidad térmica de un derivado donde la GAC fue adsorbida a través de intercambio iónico sobre Sepabeads-PEI 600 KDa, con este tipo de agregados enzimáticos (CLEA-PEIPEG óptimo). Como se puede ver en la Figura 5.17 el agregado fue mucho más estable que el derivado adsorbido iónicamente en Sepabeds-PEI 600KDa. Por lo tanto, la estabilidad de estos agregados no fue solo debido al efecto de la interacciones iónicas entre la GAC y la PEI, sino que el entrecruzamiento entre los aminos de la enzima, los aminos de la PEI y el glutaraldehído debió generar un agregado muy rígido, el cuál manifiesta muy buenas propiedades en términos de estabilidad térmica.

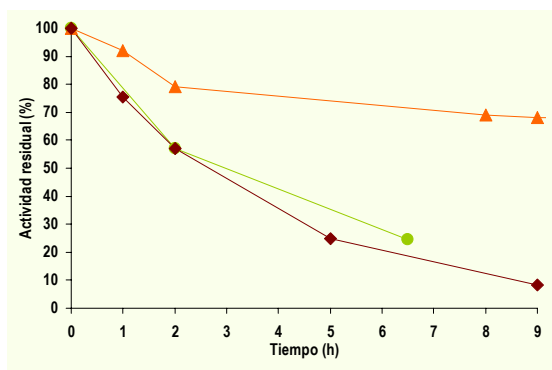
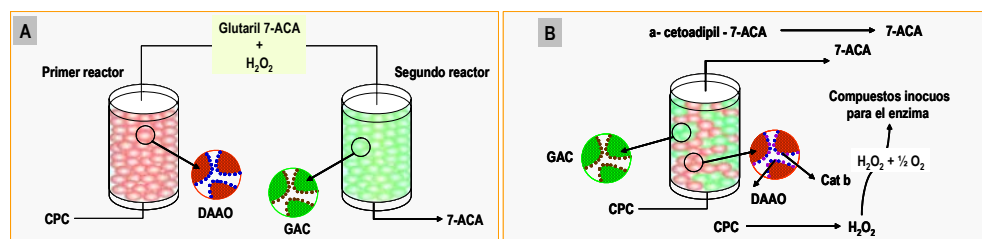


Figura 5.17 Curso de inactivación térmica del agregado más estables y de derivados inmovilizados de GAC. (▲) CLEA-PEIPEG añadiendo el glutaraldehído después de la PEI y antes del PEG. (●) GAC adsorbida en un soporte cubierto con PEI (◆) Derivado comercial de GAC suministrado por Roche. La inactivación térmica se llevó a cabo con una suspensión de 3IU/mL iniciales en fosfato de sodio 25 mM a pH 7.5 a 45°C

Además este biocatalizador puede competir con los derivados comerciales de GAC que hay en el mercado puesto que como se ve en la Figura 5.17, este agregado enzimático es 60 veces más estable a una temperatura de 45° C que el derivado comercial suministrado por Roche. Por lo tanto este derivado presenta excelentes propiedades tanto en términos de actividad (341 U/ g seco de catalizador a 25°C) como en términos de estabilidad.

5.2 Desarrollo de un nuevo sistema para la producción de 7-ACA desde Cefalosporina C (CFC) en ausencia de peróxido de hidrógeno.

Como se describe en el esquema 5.1A la reacción clásica para llevar a cabo la conversión de CFC a 7-ACA es en dos o tres reactores. Sin embargo aquí se presenta una alternativa para llevar a cabo esta reacción en un solo reactor (Esquema 5.1B).



Esquema 5.1 Conversión enzimática de CFC a 7-ACA con el sistema clásico en varios reactores (A) o con el nuevo sistema en un solo paso con un sistema multienzimático (B).

5.2.1. Conversión de CFC a 7-ACA en dos reactores. Un proceso bi-enzimático.

En el primer reactor, la DAAO inmovilizada en Gx-agarosa lleva a cabo la conversión de CFC a GL-7-ACA bajo condiciones suaves de reacción (pH 7.5 y 25° C). Se alcanzó más del 99% de conversión de CFC a los 200 minutos de reacción. La Tabla 5.4 muestra que se alcanzó un 81% de rendimiento de GL-7-ACA en este sistema.

Tabla 5.4: Resultados de la reacción en dos reactores con un sistema bi-enzimático. Un solo ciclo

Tiempo (min)	Reactores	% Conversión		% Rendimiento		
		CFC	Glutaril 7-ACA	α -cetoadipil 7-ACA	7-ACA	Productos secundarios
200	Reactor 1	0	81 \pm 4	10.3 \pm 0.4	-	4.5 \pm 0.2
30	Reactor 2	-	2.8 \pm 0.1	9.5 \pm 0.5	78.2 \pm 4.5	3.6 \pm 0.2

Además, se formó aproximadamente un 10% de α -cetoadipil 7-ACA durante la reacción. Este 10% significa que no todo el peróxido de hidrogeno formado en la deaminación oxidativa de la CFC llevada a cabo por la DAAO, fue usado para descarboxilar oxidativamente el α -cetoadipil 7-ACA a GL-7-ACA (Esquema 5.1 A). Por lo tanto este peróxido de hidrogeno remanente puede ser suficiente para inactivar las enzimas implicadas en el proceso, principalmente la DAAO. Como se puede ver en la Figura 5.18 DAAO (A) y GAC (B) fueron susceptibles a la inactivación por peróxido de hidrogeno, principalmente la primera, la cuál solo mantuvo un 20% de la actividad inicial después de 24 h de incubación con una solución 10 mM de peroxido de hidrogeno.

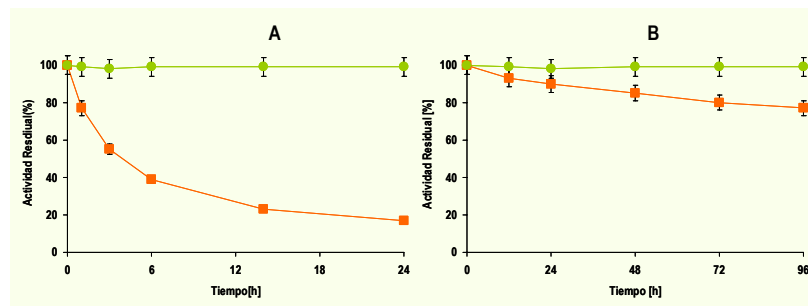


Figura 5.18 Curso de inactivación de DAO (A) y GAC (B) en presencia de peróxido de hidrógeno. (●) Enzima inmovilizada incubada sin peróxido de hidrógeno (■) Enzima inmovilizada incubada con peróxido de hidrógeno. La inactivación fue llevada a cabo con 4IU/mL iniciales de DAO o 12 UI/ mL de GAC incubadas en fosfato de sodio 25 mM pH 7, 25°C con o sin peróxido de hidrógeno 10 mM.

Una vez finalizada la primera reacción, los productos se filtraron para separarlos del biocatalizador y se incubaron con un biocatalizador GAC en un 2º reactor. En este se llevó a cabo la hidrólisis de GL-7-ACA a 7-ACA. Esta reacción se realizó bajo condiciones suaves de reacción (pH 8 y 25° C) con la GAC estabilizada mediante la estrategia descrita en 5.1.1c), donde la enzima fue adsorbida mediante intercambio iónico en un soporte cubierto con PEI, posteriormente este derivado fue entrecruzado con glutaraldehído (PEI-GAC-glut). Esta segunda reacción esta resumida en la Tabla 5.4, podemos observar como el rendimiento final de 7-ACA fue del 78 % quedando solo un 3% de GL-7-ACA sin hidrolizar (probablemente debido a razones termodinámicas) después de 30 minutos de reacción.

Un hecho que cabe destacar es la incapacidad del biocatalizador de GAC para hidrolizar el α -cetoadipil 7-ACA, producto de la primera reacción, en estos 30 min. Esta es la razón por la que el α -cetoadipil 7-ACA no fue considerado sustrato para esta enzima, de hecho, en muchas ocasiones, a los productos procedentes de la primera reacción se les trata con peróxido de hidrógeno en otro reactor para convertir todo el α -cetoadipil 7-ACA en GL-7-ACA, siendo este último el único sustrato en la reacción de hidrólisis. Esta solución es positiva desde el punto de vista del rendimiento final de 7-ACA, sin embargo el proceso sería mucho más complejo y costoso puesto que se debe usar un tercer reactor adicional.

Sin embargo, analizando este proceso y los posibles parámetros que pueden afectar al mismo, se encontró que la GAC no hidrolizaba el α -cetoadipil 7-ACA debido a la acumulación de ácido glutámico debida a la hidrólisis mucho más favorable del GL-7-ACA frente al α -cetoadipil 7-

ACA. De este modo se observó como el ácido glutámico indujo una mayor inhibición en la actividad α -cetoadipil 7-ACA acilasa que en la actividad GL-7-ACA acilasa (Figura 5.19).

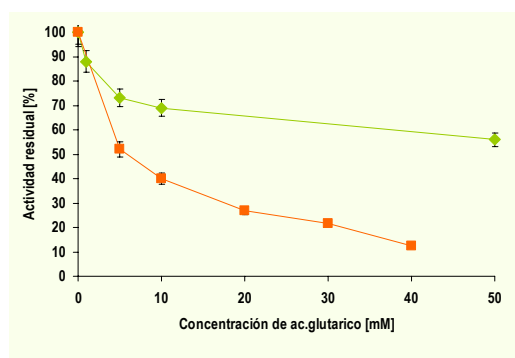


Figura 5.19. Efecto del ácido glutámico en las actividades GL-7-ACA amidasa y α -cetoadipil 7-ACA amidasa. (■) α -cetoadipil 7-ACA amidasa (♦) GL-7-ACA amidasa. Para más detalles ver Métodos 4.7.5

Por lo tanto, el principal inconveniente de este proceso es la presencia del peróxido de hidrógeno durante la reacción, el cual es capaz de inactivar a los biocatalizadores empleados en el proceso. Además el ácido glutámico no permite la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA, afectando negativamente al rendimiento.

5.2.2. Características de los biocatalizadores para ser empleados en un proceso de hidrólisis de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno.

La total eliminación del peróxido de hidrógeno en este proceso es necesaria, no solo porque este sea muy deletéreo para las enzimas participantes en el proceso, sino porque evitaría la aparición de GL-7-ACA. Paradójicamente, esto sería una ventaja, debido a que no aparecería ácido glutámico como subproducto del sistema y la actividad α -cetoadipil 7-ACA acilasa no se vería inhibida, pudiendo obtener el 7-ACA por hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA en vez de GL-7-ACA.

De este modo para llevar a cabo la conversión de CFC en 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno, los biocatalizadores usados deben tener una serie de características:

Biocatalizador de DAAO. La principal característica de este biocatalizador debe ser que no forme peróxido de hidrógeno durante la deaminación oxidativa de la CFC. Esto hecho no fue fácil, puesto que el peróxido de hidrógeno fue un producto de la reacción que cataliza la actividad DAAO. En investigaciones anteriores se diseñó una solución a este problema, consistió en la co-

inmovilización de dos enzimas (DAAO y CATb) en el mismo soporte con el objetivo de que la CATb descompusiera el peróxido de hidrógeno inmediatamente después de ser producido por la DAAO. La ausencia total de GL-7-ACA en la reacción fue usada como indicador de la ausencia total de peróxido de hidrógeno en esta. En investigaciones precedentes a esta Tesis Doctoral se evaluaron diferentes relaciones de mg de DAAO y mg de CATb en el biocatalizador co-inmovilizado para eliminar totalmente el peróxido de hidrógeno en la deaminación oxidativa de CFC. Los mejores resultados fueron logrados cuando la relación mg de DAAO:mg de CATb fue de 1:10. (Betancor, 2005; Lopez-Gallego y col., 2005).

Biocatalizador de GAC: La característica principal que requiere este biocatalizador reside en la capacidad del mismo para hidrolizar el α -cetoadipil 7-ACA a 7-ACA. Por este motivo se estudiaron los parámetros cinéticos del biocatalizador de GAC (PEI-GAC-glut) usado en este proceso, usando el α -cetoadipil 7-ACA como sustrato (Tabla 5.5).

Table 5.5: Parámetros cinéticos de GAC con Glutaril 7-ACA y α -cetoadipil-7ACA.

Parámetros cinéticos	Actividad glutaril amidasa	actividad α -keto-adipil amidasa
Km (mM)	1.06 ± 0.05	4.9 ± 0.3
Kcat (min^{-1})	87.8 ± 0.7	2.8 ± 0.5
Kcat/Km ($\text{min}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$)	82.8 ± 0.4	0.56 ± 0.02

En la tabla 5.5, se puede observar como el derivado inmovilizado de GAC fue capaz de producir 7-ACA a partir de α -cetoadipil 7-ACA pero de un modo mucho menos efectivo que cuando lo hizo a partir de GL-7-ACA. Esto fue debido a que este derivado de GAC presentó un valor de Km para el α -cetoadipil 7-ACA 4 veces más grande que para el GL-7-ACA. Además, la Kcat fue en torno a 30 veces mayor para GL-7-ACA que para el α -cetoadipil 7-ACA. A pesar de que las propiedades catalíticas de esta enzima para hidrolizar el α -cetoadipil 7-ACA no fueron demasiado buenas, fueron suficientes para poder llevar a cabo el proceso de conversión de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno.

5.2.3. Conversión de CFC a 7-ACA en dos reacciones mediante un sistema tri-enzimático.

La conversión de CFC a 7-ACA sin peróxido de hidrógeno fue llevada a cabo usando el derivado co-inmovilizado DAAO/CATb en el primer paso (deaminación oxidativa de CFC), y el derivado de GAC (PEI-GAC-glut) en el segundo paso (hidrólisis del α -cetoadipil 7-ACA). Cuando la conversión de CFC en ausencia de peróxido de hidrógeno fue llevada a cabo en dos reactores, el rendimiento de α -cetoadipil 7-ACA en el primero no fue demasiado alto, aunque no apareció nada de GL-7-ACA en todo el proceso (Tabla 5.6).

Table 5.6. Resultados del sistema en dos reactores con el sistema tri-enzimático en ausencia de peróxido de hidrógeno. Un solo ciclo.

Tiempo (min)	Reactor	% Conversión		% Rendimiento		
		CFC	Glutaril 7-ACA	α -cetoadipil 7-ACA	7-ACA	Productos secundarios
200	Reactor 1	0	0	54.3 \pm 1.1	-	13.3 \pm 0.4
133	Reactor 2	-	0	0.20 \pm 0.01	48 \pm 2	9.19 \pm 0.46

Este hecho condujo a un rendimiento final de 7-ACA mucho más bajo (47 %) que en el proceso convencional en presencia de peróxido de hidrógeno (78%). Este hecho pudo ser explicado porque el α -cetoadipil 7-ACA fue bastante inestable, siendo rápidamente descompuesto a productos desconocidos. La Figura 5.20 muestra como después de 18 h bajo las condiciones de reacción (pH 7.5 y 25°C) el 80% del α -cetoadipil 7-ACA había desaparecido. Por este motivo este proceso no parece muy útil industrialmente.

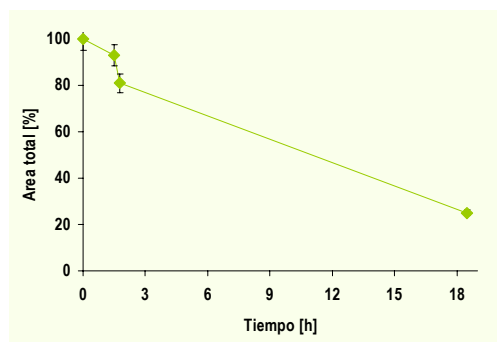


Figura 5.20. Desaparición del α -cetoadipil 7-ACA con el tiempo. (♦) Áreas de α -cetoadipil 7-ACA. Este sustrato fue incubado a pH 8, 25°C a una concentración de 15mM

5.2.4. Conversión directa de CFC a 7-ACA en solo un reactor mediante un sistema tri-enzimático.

Una posible solución al problema descrito en el apartado anterior (5.2.3) sería evitar la acumulación del α -cetoadipil 7-ACA durante la reacción hidrolizando este inmediatamente después de ser producido. El desarrollo de este sistema implica un único reactor con dos biocatalizadores distintos, uno el de DAAO y CATb co-inmovilizadas en Gx-agarosa y el otro el de GAC adsorbida en soporte recubierto con PEI y entrecruzada con glutaraldehído (PEI-GAC-glut). En este sistema, se llevó a cabo la deaminación oxidativa de CFC por la DAAO con la descomposición *in situ* del peróxido de hidrogeno por parte de la CATb. Además el α -cetoadipil 7-ACA fue hidrolizado también *in situ* a 7-ACA por el biocatalizador de GAC evitando su acumulación (Esquema 5.1)

Este nuevo sistema alcanzó un rendimiento final de 7-ACA del 80% en 180 minutos. Además, solamente el 2.5% de α -cetoadipil 7-ACA no fue hidrolizado al final del proceso (Figura 5.21).

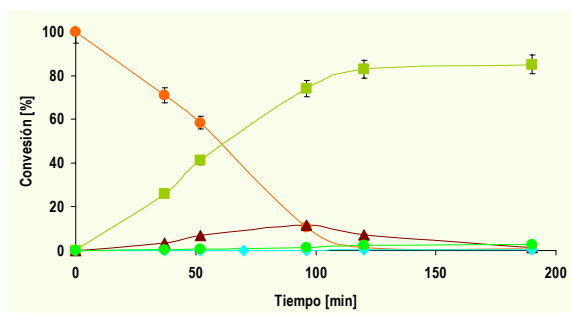


Figura 5.21: Conversión directa de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrogeno. La reacción se llevo a cabo según se describió en Métodos 2.12. (■) 7-ACA (●) CFC (▲) α -cetoadipil 7-ACA (●) productos secundarios (♦) GL-7-ACA.

5.3 Mejora de la actividad α -cetoadipil acilasa de GAC mediante técnicas de biología molecular.

Diferentes mutantes de GAC, con diferentes mejoras en la actividad a través de adipil 7-ADCA (Sio y col., 2002; Otten y col 2002; Sio y col., 2004), (sustrato con una cadena lateral de la misma longitud que el α -cetoadipil 7-ACA), se obtuvieron mediante técnicas de evolución dirigida y mutagénesis al azar dentro de un diseño racional. Estos mutantes fueron elegidos para llevar a cabo la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA.

5.3.1. Caracterización cinética de la actividad de GAC nativa y mutantes en la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA.

Los parámetros catalíticos de estos mutantes y de la enzima nativa con este sustrato y con el GL-7-ACA se muestran en la Tabla 5.7..

Tabla 5.7. Parámetros cinéticos de GAC nativa y diferentes mutantes de esta con Glutaril 7-ACA y α -cetoadipil 7-ACA.

Enzima	Glutaril 7-ACA			α -cetoadipil 7-ACA		
	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} t/K _m	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m
Wt	0,34	2	5,8	3,9	0,12	0,03
Y178H	0,8	1,4	1,7	2,21	0,4	0,18
N266H	0,4	2,33	6,06	5,06	0,24	0,047
Y178H/N266H	1,4	0,5	0,35	19,4	0,05	0,003
Y178F/F375H	2,81	0,33	0,12	1,27	0,77	0,63

La enzima nativa presentó unos valores de K_m y K_{cat} 11 veces mayor y 17 veces menor, respectivamente, para la hidrólisis del α -cetoadipil 7-ACA que los mismos valores para la actividad GL-7-ACA acilasa de esta enzima.

Se estudiaron dos mutantes simples, el mutante N266H que mostró una eficiencia catalítica similar a la enzima nativa para el α -cetoadipil 7-ACA. Este hecho fue principalmente debido al alto valor de K_m de N266H, este valor fue incluso más alto que el valor de K_m de la enzima nativa para este sustrato. Ahora bien, cuando se estudiaron estos mismos parámetros para el sustrato GL-7-ACA, este mutante también se comportó de un modo muy similar a la enzima nativa (Tabla 5.7). Sin embargo el otro mutante simple Y178H mostró una eficiencia catalítica 6 veces más alta para esta nueva actividad que la de la enzima nativa para este mismo sustrato. Esta mejora en la eficiencia

catalítica se debió principalmente al incremento en la K_{cat} para este sustrato (el valor de K_m disminuyó ligeramente) con respecto a la enzima nativa. Por otro lado, cuando se estudió el comportamiento de este mutante en la hidrólisis de GL-7-ACA, se pudo observar como disminuyó la eficiencia catalítica con respecto a la enzima nativa, este descenso fue debido principalmente al aumento de la K_m .

Además se estudió la actividad α -cetoadipil 7-ACA acilasa de dos mutantes dobles. La eficiencia catalítica del mutante doble Y178H/N266H (Sio, 2005) con α -cetoadipil 7-ACA fue la más baja de todos los mutantes estudiados, incluso fue 10 veces más baja que la eficiencia catalítica de la enzima nativa para este sustrato. El que este parámetro sea tan bajo es debido tanto al aumento de la K_m como a la disminución de la K_{cat} (Tabla 5.7) con respecto a la enzima nativa. Además, estos malos resultados se repitieron en la hidrólisis de GL-7-ACA (Tabla 5.7), por lo que parece que esta combinación de mutaciones en las posiciones 178 y 266 genera bastantes problemas en la actividad hidrolasa de esta enzima.

El otro doble mutante estudiado fue el Y178F/F375H, éste se obtuvo mediante diseño racional de la mutagénesis al azar de los aminoácidos más importantes implicados en la interacción entre la enzima y el sustrato (Sio,2005). Este doble mutante mostró los mejores resultados tanto en términos de K_m como de K_{cat} para la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA, de este modo se obtuvo una mejora de 3 y 6.4 en K_m y K_{cat} , respectivamente, con respecto a los valores que presentó la enzima nativa. Además la eficiencia catalítica de este doble mutante en la hidrólisis de GL-7-ACA fue mucho menor (casi 20 veces menor) que la eficiencia de la enzima nativa a través del mismo sustrato (Tabla 5.7).

5.3.2 Efecto de la mejora en la actividad α -cetoadipil 7-ACA acilasa en la conversión directa de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrogeno.

La conversión de CFC a 7-ACA fue llevada a cabo con un sistema tri-enzimático en un sólo reactor y con diferentes relaciones en masa de proteína GAC/DAAO. En este sistema se comparó el comportamiento de la enzima nativa con el del mutante Y178F/F375H (mutante que presentó las mejores propiedades en la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA) (Figura 5.22).

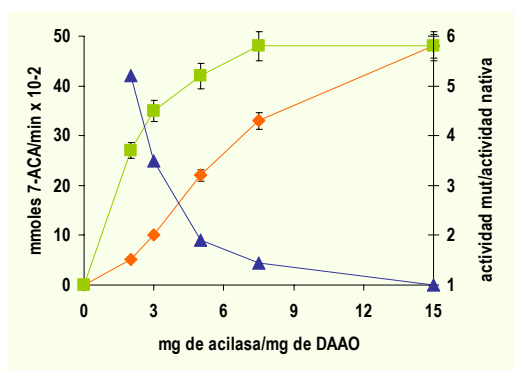


Figura 5.22. Velocidad de aparición de 7-ACA desde CFC con diferentes GAC. Actividad de aparición de 7-ACA con el mutante Y178F/F375H (■) y con el enzima nativa (♦). Relación entre la actividad de aparición del 7-ACA del mutante y el enzima nativa (▲). Las reacciones se llevaron a cabo como describe Métodos 4.12 pero con diferentes relaciones en peso de los biocatalizadores DAAO/CATb y GAC.

Ambos mutantes fueron inmovilizados en soportes cubiertos con PEI 600KDa y posteriormente entrecruzados con glutaraldehído con el protocolo óptimo (Ver 5.1.1 c)).

La actividad específica para la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA de estos dos derivados fue de 0.058 y 0.5 IU/mg de proteína para la enzima nativa y el doble mutante, respectivamente. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos para los valores de K_{cat} de estas enzimas con este mismo sustrato (Tabla 5.7).

Debido a que la actividad específica de DAAO en la deaminación oxidativa fue mucho mayor a la actividad específica de GAC nativa en la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA (en torno a 20 veces mayor comparando las enzimas nativas), en este sistema, a igual cantidad proteica de GAC y DAAO, la velocidad de conversión de CFC sería mucho mayor que la velocidad de aparición de 7-ACA. Por lo tanto aumentando la cantidad de GAC (mg de proteína) y manteniendo constante la cantidad de DAAO (mg de proteína) el tiempo de reacción sería menor, además se acumularía menos α -cetoadipil 7-ACA.

En la figura 5.22 podemos observar como con un exceso de 15 veces en la cantidad de proteína de GAC con respecto de DAAO, la velocidad de aparición de 7-ACA en el sistema es casi la misma para el enzima nativa que para el mutante doble. Además en estas condiciones la velocidad de conversión de CFC fue similar (ligeramente superior) que la velocidad de aparición de 7-ACA. Sin embargo, con el mutante doble solo se requirió de un exceso de 5 veces (3 veces menos que para el enzima nativa) de GAC con respecto a DAAO, para lograr la misma velocidad de aparición de 7-ACA. Además, cabe resaltar que cuando la relación DAAO:GAC en mg de proteínas fue 1:2, el

mutante expresó una actividad de formación de 7-ACA, 5.5 veces superior a la que mostró la enzima nativa (Figura 5.22).

Otro parámetro importante fue la acumulación de α -cetoadipil 7-ACA durante el proceso. En la figura 5.23, se puede observar que cuanto mayor es la cantidad de GAC en el sistema menor es la cantidad de α -cetoadipil 7-ACA acumulado, debido a que las actividades DAAO y α -cetoadipil 7-ACA acilasa se van igualando. Además, en esa misma figura se puede observar que cuando el exceso de GAC con respecto a DAAO fue solo dos veces, condiciones en que la actividad α -cetoadipil 7-ACA es mucho menor que la actividad DAAO, la enzima nativa acumulo mucho más α -cetoadipil 7-ACA (casi un 80%) que el mutante doble que solamente acumulo un 37%.

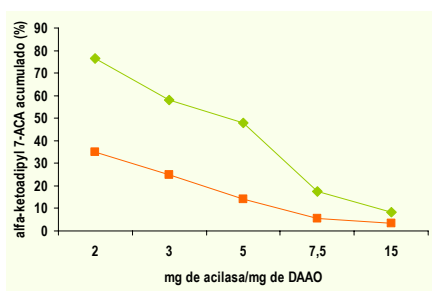
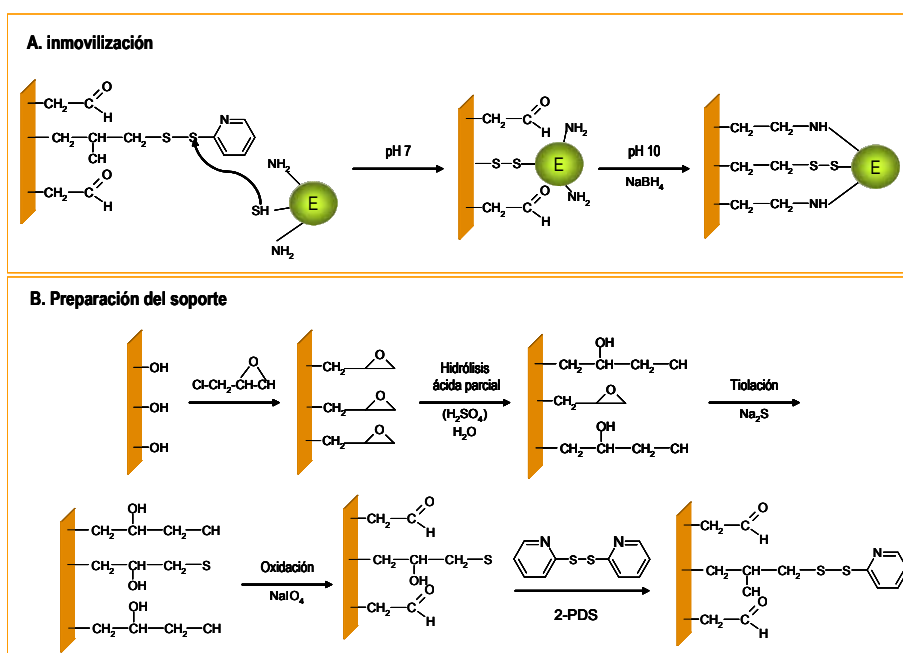


Figura 5.23. Acumulación de α -cetoadipil 7-ACA en la conversión de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrogeno con diferentes GAC. Acumulación de α -cetoadipil 7-ACA con el mutante Y178F/F375H (■) y con el enzima nativa (◆). Las reacciones se llevaron a cabo como describe Métodos 2.12 pero con diferentes relaciones en peso de los biocatalizadores DAAO/CATb y GAC.

5.4 Inmovilización-rigidificación orientada de PGA en soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol.

En esta tesis nos propusimos sintetizar una nueva generación de soportes bifuncionales tiolados. En este caso intentamos tener un soporte con un mínimo de grupos tioles, suficientes para llevar a cabo la inmovilización a través de los grupos SH superficiales de las proteínas, y con un gran número de grupos glioxiles para facilitar la unión covalente multipuntual irreversible.

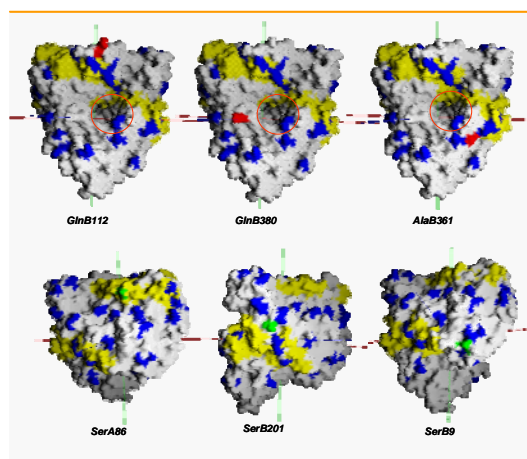
Esquema 5.2 Soportes bifuncionales azarosa glioxil-tiol



En estos soportes el mecanismo de inmovilización/rigidificación es muy similar al descrito para los soportes bifuncionales epóxido-tiol (Grazu y col., 2005). En el caso de este nuevo soporte, la primera etapa de inmovilización es a través de un intercambio tiol-disulfuro entre los sulfuros del soporte activados con 2-piridil-disulfuro y los grupos SH de las cisteínas superficiales de la enzima. La segunda etapa de rigidificación se lleva a cabo a pH alcalino, donde los glioxiles del soporte reaccionan con los ϵ -amino de las lisinas superficiales formando *bases de Schiff* reversibles entre la enzima y el soporte que deben ser reducidas a un enlace amino secundario irreversible mediante borohidruo de sodio (Esquema 5.2A)

Sin embargo, para que la orientación sea única en estos nuevos soportes fue necesario introducir un residuo cisteína a enzimas (para llevar a cabo el intercambio tiol-disulfuro) que en su secuencia aminoácida no poseyeran ningún residuo de este tipo, este es el caso de la PGA. Por este motivo, en trabajos anteriores se desarrollaron 6 mutantes de PGA (Gln B380, Gln B112, Ala

B361, Ser B9, Ser B201, y Ser A86). Cada una de estas posiciones fue sustituida con una cisteína, de este modo cada mutante tendrá el grupo tiol en una zona diferente de la superficie enzimática. Todas las zonas tenían en común que la cisteína estaba rodeada de varios residuos de lisina para favorecer la rigidificación mediante unión covalente multipuntual (ESQUEMA 5.3)(Grazu,2006)



Esquema 5.3- Representación en Grasp de los residuos de la PGA seleccionados para ser reemplazados por cisteína. En verde: residuos serina para ser mutados por cisternas. En rojo: residuos diferentes a serinas para ser mutados por cisteínas, en azul: lisinas, amarillo: cadena α de la PGA, y gris: cadena β de la PGA. Círculo rojo: representa en hueco donde se aloja el sustrato para que la serina catalítica (Ser B1) pueda llevar a cabo la catálisis

Estos soportes fueron sintetizados a partir de agarosa, la cual fue activada con epíclorhidrina, con el objetivo de activar la agarosa con grupos epóxido. Posteriormente, se llevo a cabo una etapa de hidrólisis ácida parcial para dejar un soporte con pocos grupos epóxido. Después estos grupos epóxido fueron tiolados en presencia de un agente tiolante (sulfuro de sodio). Finalmente, este soporte con grupos sulfuro y con dioles, fue oxidado con periodato para convertir los dioles en grupos glioxiles reactivos. De este modo tendríamos un soporte activado con pocos grupos sulfuro y muchos grupos glioxiles. Finalmente para poder inmovilizar el enzima tiolada en estos soportes, éstos deben ser activado con 2-piriildisulfuro (Esquema 5.2 B). La preparación del soporte se redactó más en detalle en Métodos 4.4.3.

Estos nuevos soportes fueron caracterizados, se pudieron valorar 200 µmoles de grupos glioxiles/ g soporte, mediante valoración con yoduro potásico y en medio alcalino, y en torno a 4 µmoles de grupos SH/g soporte, valorados con 2-Piridil sulfuro (Grazu, 2006). Además cuando la PGA tiolada genéticamente fue inmovilizada en estos soportes se pudo observar como la primera

inmovilización se llevo a cabo a través del intercambio tiol-disulfuro entre la enzima y el soporte, puesto que no hubo inmovilización de la PGA no tiolada en estos soportes a pH 7. Otra evidencia de que la inmovilización se llevó a cabo a través de un intercambio tio-disulfuro fue la inmovilización de la PGA tiolada en un soporte control, exactamente con el mismo número de grupos tiol que los soportes bifuncionales pero sin grupos glioxil.

Otro dato a resaltar es la reversibilidad del enlace covalente tiol-disulfuro, puesto que toda la actividad enzimática pudo ser desorbida de estos soportes control al incubarse con Di-tiotreitol (agente capaz de reducir los enlaces disulfuro). Sin embargo cuando la PGA fue inmovilizada en soportes bifuncionales tiol-glioxil, solamente con la inmovilización a pH 7 no se pudo desorber toda la actividad enzimática en presencia de Di-tiotreitol como ocurría en el caso de los controles.

Adicionalmente, cuando el derivado inmovilizado fue incubado a pH 10 durante 3 horas y posteriormente reducido los derivados consiguieron una unión covalente multipuntual tan intensa que nada de actividad pudo ser desorbida del soporte en presencia de Di-tiotreitol (Figura 5.24A).

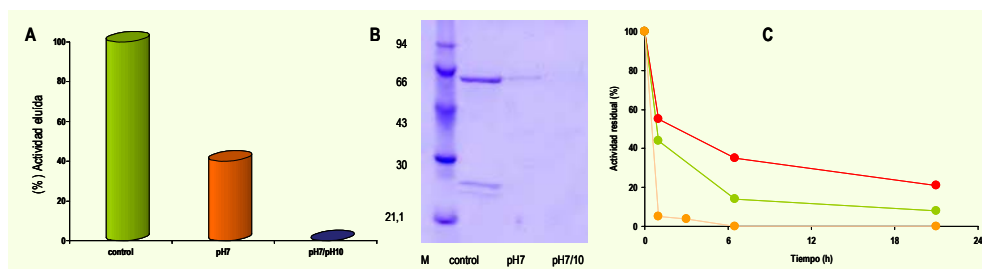


Figura 5.24.(A): Actividad desorbida en presencia de di-tiotreitol. Los diferentes derivados sin reducir fueron incubados con 50mM de di-tiotreitol a pH8, 25°C. **(B) Análisis electroforético SDS-PAGE de la enzima liberada de los soportes agarosa Gx-sh.** Los derivados fueron resuspendidos en tampón de desnaturalización como se describe en Métodos 4.3. M: Marcadores de peso molecular. Control: PGA inmovilizada en soportes control sin grupo Glioxil, pH7: PGA inmovilizada en soportes agarosa Gx-sh a pH 7 y posteriormente reducido, pH7/10: PGA inmovilizada en soportes agarosa Gx-sh a pH 7 e incubados 3 horas a pH10 y finalmente reducidos. **(C): Efecto de la incubación a pH alcalino en la estabilidad de los derivados inmovilizados sobre soportes bifuncionales agarosa Gx-SH.** PGA fue inmovilizada en soportes (●) Gx-SH agarosa a pH 7 y reducidos (●) Gx-SH agarosa a pH 7 y 3h incubado a pH 10 y reducidos (●) agarosa control (soportes sin grupos glioxiles), solo grupos SH, a pH 7. Las inactivaciones térmicas se llevarán a cabo a 60°C, pH 7 en fosfato de sodio 50 mM. Suspensión inicial de 1.5IU/ mL susp)

Todos estos resultados se pusieron de manifiesto cuando los derivados inmovilizados en el soporte control, los inmovilizados a pH 7 y reducidos, y los inmovilizados a pH 7 incubados a pH 10 y finalmente reducidos fueron analizados por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se observó como la enzima fue liberada totalmente al sobrenadante en el caso de los primeros, parcialmente en el caso de los segundos y nada de la enzima se observó en el sobrenadante en el caso de los terceros (Figura 5.24B).

Esto nos llevó a pensar que la incubación a pH 10 fue necesaria para obtener una unión covalente irreversible entre todas las moléculas de enzima y el soporte. Este resultado estuvo en concordancia con los ensayos de estabilidad térmica, donde la enzima tiolada inmovilizada en el soporte control, la cual no está unida de forma irreversible con el soporte, mostró los peores resultados en términos de estabilidad. Sin embargo los derivados que se incubaron a pH 10 después de la inmovilización a pH 7 mostraron una mayor estabilización que en el caso del derivado que solo fue inmovilizado a pH 7 (Figura 5.24C) y por supuesto ambos fueron mucho más estables que el derivado control.

Una vez caracterizados este tipo de soportes, sabiendo que son capaces de lograr una interacción covalente irreversible muy intensa entre la enzima y el soporte, analizamos como afecta la zona a través de la cual se inmoviliza la enzima, en la estabilidad de la misma. Los diferentes mutantes descritos en el Esquema 5.3, desarrollados según Grazu, 2006, fueron inmovilizados en estos soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol.

Todos los mutantes fueron inmovilizados cuantitativamente y las actividades expresadas de cada uno de ellos durante todo el proceso se muestran en la tabla 5.8. Posteriormente estos derivados fueron incubados 3h a pH alcalino, para ser finalmente reducidos con borohidruro de sodio, para lograr una unión covalente irreversible más intensa entre el enzima y el soporte. Con el objetivo de tener una referencia en los ensayos de estabilidad, la PGA nativa (no tiolada) fue inmovilizada en estos soportes directamente a pH 10, e incubada en estas condiciones durante 3h. La inmovilización de la enzima nativa (no tiolada) en estos soportes equivale a la inmovilización en un glioxil normal, puesto que la inmovilización solo ocurriría a través de la zona más rica en lisinas, debido a que no habría intercambio tiol-disulfuro.

Tabla 5.8. Inmovilización y rigidificación de diferentes mutantes de PGA inmovilizados en soportes agarosa glioxil-tiol.

Mutante	Rendimiento de inmovilización (%) ^a	Actividad expresada de los derivados inmovilizados a pH 7 (U/g) ^b	Actividad expresada de los derivados inmovilizados a pH 7 y después rigidificados a pH 10 (U/g) ^b
A86	100	40	33
B9	100	72	63
B112	100	50	43
B201	100	64	56
B361	100	57	50
B380	100	69	60

^a (Actividad de la suspensión control – actividad del sobrenadante/ Actividad de la suspensión control)

^b (Actividad expresada por el derivado después del proceso de inmovilización/ Actividad inmovilizada teniendo en cuenta ^a)

Cuando se estudio la estabilidad en condiciones de alta temperatura (60°C), se pudo observar como la zona a través de la cual se oriente la enzima en el proceso de inmovilización no tuvo un gran efecto en el estabilidad térmica. Las estabilidades de los derivados inmovilizados de todos los mutantes y la enzima nativa fueron muy similares (Datos no mostrados). De un modo muy distinto se comportaron los diferentes derivados en el ensayo de inactivación frente a disolventes orgánicos, donde el derivado inmovilizado a través de la cisteína en la posición B201 mostró la mayor estabilización de todos los derivados estudiados (Figura 5.25). Cabe resaltar que el derivado inmovilizado-rigidificado a través del residuo B361 fue más inestable que el derivado inmovilizado-rigidificado de la enzima nativa, por lo que parece la rigidificación de esta zona afecta negativamente a la estabilidad frente a disolvente orgánicos.

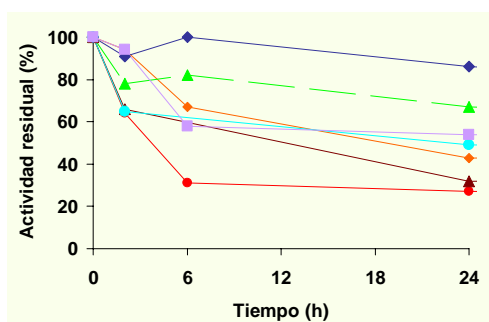


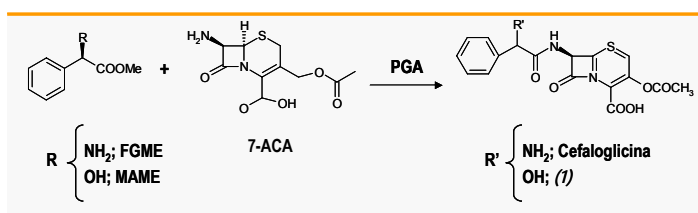
Figura 5.25: Estabilidad de diferentes mutantes inmovilizados-rigidificados en el soporte Gx-SH Frente a disolventes orgánicos. Todos los derivados fueron inmovilizados en Gx-SH agarosa a pH 7 (excepto la PGA nativa que se inmovilizó directamente a pH 10) y rigidificados a pH10 durante 3h, finalmente todos los derivados fueron reducidos. Los experimentos se realizaron a 4°C, pH 7 en fosfato de sodio 25 mM y 60% de dioxano. La suspensión inicial presentó una actividad de 0.3 U/mL. (◆) Wt pH 10 (●) B361 (●) B9 (■) A86 (▲) B380 (▲) B112 (◆) B201

5.5 Síntesis de Cefalosporinas semisintéticas catalizadas por PGA

5.5.1 Síntesis Cinéticamente Controlada. Mejora de la Tasa Vs/Vh1.

La Síntesis Cinéticamente Controlada (SCC) es muy compleja debido a que no hay una sola reacción controlada por un equilibrio termodinámico como ocurre en la Síntesis Termodinámicamente Controlada (STC). Como se describió en la Introducción, la síntesis de antibióticos a través de esta estrategia (SCC) implica una reacción de síntesis, la cual es la de nuestro interés, y dos reacciones de hidrólisis, una la hidrólisis del éster (V_{h1}) y otra la hidrólisis del antibiótico (V_{h2}). (Figura 1.19). Las velocidades de estas tres reacciones van a determinar el rendimiento máximo final. Por un lado está la relación entre la velocidad de síntesis del antibiótico (V_s) y la velocidad de hidrólisis del mismo (V_{h2}), este parámetro se mejora exclusivamente extrayendo el antibiótico del medio de reacción, para lo cual se recurre a la ingeniería de la reacción diseñando medios en los que el antibiótico se quede en una fase distinta a la fase donde se lleva a cabo la síntesis, evitando la hidrólisis de este (Terreni y col 2004, Hernandez-Justiz y col 1998). Por otro lado, la relación entre la velocidad de síntesis del antibiótico (V_s) y la velocidad de hidrólisis del éster (V_{h1}) nos dará un parámetro llamado *Tasa s/h1*, esta tasa determina el rendimiento máximo final teórico, y depende de muchas variables como son; el medio reacción (polaridad del medio, conductividad...), las condiciones de reacción (pH, T^a ...) ó las propiedades del biocatalizador, siendo esta última en la que vamos a centrar nuestro estudio.

Por lo tanto, se eligió una reacción modelo, la síntesis del ácido 7-[(1-hidroxi-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico, importante precursor en la síntesis del cefamandol (ESQUEMA 5.4). Se estudiaron diferentes variables, para mejorar el comportamiento del biocatalizador en términos de *Tasa s/h1* para esta reacción modelo.



Esquema 5.4- Síntesis Cinéticamente Controlada (SCC) de antibióticos cefalosporánicos y semisintéticos. FGME= L-fenilglicina metiléster; MAME= metil R- α -hidroxi-fenilacetato. (1) ácido 7-[(1-hidroxi-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico (intermediario en la síntesis del antibiótico cefamandol).

a) **Efecto de la estrategia de inmovilización en la Tasa $s/h1$:** Se llevó a cabo la inmovilización de la PGA en diferentes soportes a través de diferentes químicas de unión entre la enzima y el soporte. Como se puede observar en la (figura 5.26), la Tasa $s/h1$ aumentó con la concentración de núcleo antibiótico para los diferentes derivados, esto es lógico debido a la saturación del centro activo con este sustrato, favoreciendo la síntesis (Youshko y col., 2004).

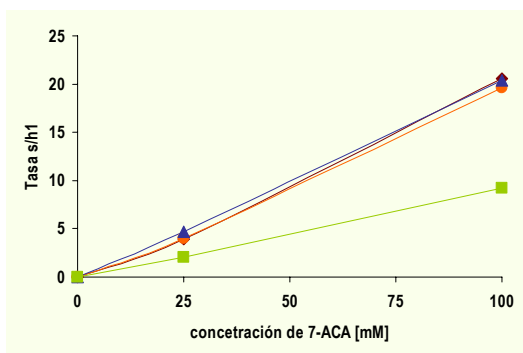


Figura 5.26. Efecto de la concentración de 7-ACA en la Tasa $s/h1$ de la síntesis del precursor del cefamandol con diferentes biocatalizadores de PGA. La enzima fue inmovilizada en (♦) agarosa activada con CNBr (▲) agarosa activada con glutaraldehído (■) agarosa activada con grupos glioxil y (■) Eupergit C. La reacción fue llevada a cabo con una concentración fija de R-Mandelato de Metilo 25 mM en fosfato de sodio 25 mM pH 6.5 a 25°C. Más detalles en sistema acuoso Métodos 4.14

Por otro lado se observó que de todos los métodos de inmovilización empleados, la inmovilización en Eupergit C (soporte activado con grupos epóxido) mostró los peores resultados en términos de Tasa $s/h1$. Sin embargo el resto de soportes utilizados (agarosa activada con glutaraldehído, con bromocianogeno y con glioxil) presentaron resultados muy similares, incluso fue muy similar en los tres el efecto de la concentración de núcleo β -lactámico en la Tasa $s/h1$ (Figura 3.25).

Por lo tanto, la inmovilización de PGA en un soporte activado con grupos glioxiles (Gx-agarosa) mostró muy buenas propiedades en términos de Tasa $s/h1$ en la SCC de antibióticos β -lactámicos. Además, se ha descrito que este soporte (Gx-agarosa) es capaz de logra una alta estabilización de la PGA (Guisan 1988). De este modo, basándonos en los buenos resultados en términos de su comportamiento en SCC y en términos de estabilidad, la PGA fue inmovilizada sobre este soporte para llevar a cabo posteriores estudios con el objetivo de mejorar de la Tasa $s/h1$.

b) **Efecto del medio de reacción en la Tasa $s/h1$.** Otra variable importante en este parámetro fueron las propiedades del medio de reacción, propiedades tales como la temperatura, el pH, la polaridad ó la conductividad de éste. Multitud de investigaciones previas han estudiado el

efecto de estas diferentes propiedades del medio de reacción en la SCC (Aguirre y col., 2002; Goncalves y col., 2002; Trasvacio y col., 2002; Giordano y col., 2006). En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el efecto de dos, la polaridad y la fuerza iónica del medio, sobre la *Tasa s/h1* estableciendo el pH en 6.5 y la T en 25° C para todas las reacciones, basándonos en investigaciones previas (Giordano y col 2005).

De este modo se llevaron a cabo las reacciones de síntesis del precursor del Cefamandol en presencia de un co-solvente apolar, como es el metanol. Este tuvo un efecto positivo en la *Tasa s/h*, aumentado ésta desde 4.7 a 5.6 (Figura 5.27). Por otro lado, se llevaron a cabo reacciones de síntesis del precursor del cefamandol en presencia de 2 M de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). Al contrario que cuando se usó un medio más apolar en presencia de metanol, el sulfato de amonio empeoró la *Tasa s/h1*, bajando esta desde 4.7 a 3.7 (Figura 5.27).

De este modo este parámetro pasó de 3.7 en presencia de alta fuerza iónica (2M de sulfato de sodio) a 5.6 en presencia de un co-solvente (20% de Metanol) tan solo variando las condiciones del medio.

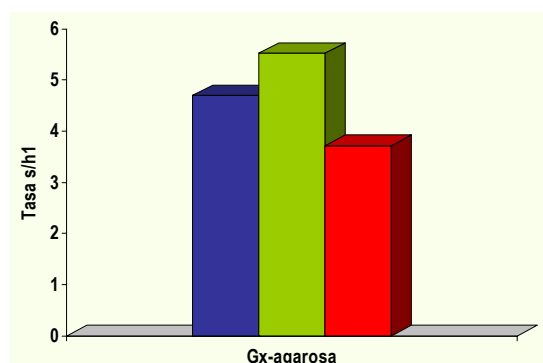


Figura 5.27. Efecto del medio de reacción en la Tasa s/h1 de la síntesis del precursor del Cefamandol. Las reacciones fueron llevadas a cabo con PGA inmovilizada en Gx-agarosa con 25 mM de R-Mandelato de Metilo y 25 mM de 7-ACA en fosfato de sodio 25 mM pH 6.5 a 25°C. (■) Fosfato de sodio (■) Metanol 20% (■) Sulfato de amonio 2M. Más detalles en sistema acuoso en Métodos 4.14

c)Efecto de la orientación de la enzima en la inmovilización en presencia de metanol. Búsqueda de la mejor orientación para conseguir el mayor efecto del metanol en la Tasa s/h1. Hemos visto que en presencia de metanol en el medio de reacción, la PGA presentó una mejora en sus propiedades sintéticas. Partiendo de la hipótesis de que el efecto positivo del metanol en las propiedades sintéticas podría estar relacionado con un cambio conformacional, inducido por el propio metanol, en la estructura tridimensional del enzima, se planteó “congelar” este cambio conformacional, e identificar la zona de la superficie proteica más susceptible al efecto del metanol.

Para lo cuál, se busco una estrategia que permitiera la rigidificación orientada de diferentes zonas de la superficie proteica en presencia de metanol.

Por otro lado el soporte que mejores resultados nos ha ofrecido en términos de *Tasa s/h1* fue el la agarosa activada con grupos glioxiles. Además, la inmovilización en estos soportes ha logrado mejorar la estabilidad de múltiples enzimas de interés industrial (Guisan 1988 y Mateo y col 2005). Estas estabilizaciones se tradujeron, generalmente, en un rigidificación de la estructura terciaria de la proteína, lo cuál demuestra que este sistema de inmovilización permite una unión muy intensa entre la enzima y el soporte. En el caso de la PGA, ya se ha demostrado que hay un gran número de uniones entre la enzima y este tipo de soportes (Grazu, 2005)

De este modo, los nuevos soportes agarosa glioxil-tiol (Gx-SH agarosa) desarrollados en el apartado 5.4, permitirían la inmovilización orientada por varias zonas de la superficie proteica a través de un intercambio tiol-disulfuro entre la cisteína, introducida por ingeniería genética, del mutante y los grupos sulfuro activados del soporte. Posteriormente a esta inmovilización orientada, este soporte, en condiciones alcalinas, fue capaz de establecer uniones covalentes irreversibles, como fue demostrado en el apartado 5.4, gracias a la interacción de los grupos glioxiles de este soporte con los grupos ϵ -amino de las lisinas superficiales de la PGA.

Por lo tanto, combinando el uso de los 6 mutantes de PGA (descritos en el Esquema 5.4) con un residuo cisteína en diferentes zonas de su superficie y los nuevos soportes agarosa glioxil-tiol (Gx-SH agarosa)(Esquema 5.3 y 5.4), se podría lograr la inmovilización-rigidificación orientada de diferentes zonas de la superficie de la PGA en presencia de metanol.

Partiendo de esta premisa, se llevó a cabo la inmovilización orientada a pH 7 a través de la zona con el residuo cisteína y posteriormente se realizó la rigidificación de esa zona a pH 10 en presencia de metanol. El objetivo de esta estrategia de inmovilización-rigidificación orientada fue “congelar” las posibles conformaciones tridimensionales que adoptaron cada uno de los mutantes en presencia de este agente distorsionante. Todos los mutantes presentaron una menor actividad al incubarlos a pH 10 en presencia de metanol 20% que los que solo fueron incubados a pH 10. La pérdida de actividad fue distinta según cada mutante (Tabla 5.9). Incluso estos derivados se incubaron con 40% de metanol, pero no se pudo detectar la actividad en los derivados resultantes.

Resultados

Esto nos da una idea de que, posiblemente, la rigidificación de la estructura fue distinta en presencia que en ausencia de metanol.

Tabla 5.9. Actividad de los diferentes mutantes inmovilizados en Gx-SH-agarosa y rigidificados en presencia y ausencia de metanol.

Enzima	Actividad de derivados (UI/g) rigidificados sin metanol	Actividad de derivados (UI/g) rigidificados con 20% metanol	(Actividad metanol/Actividad sin metanol)x100
Wt	0.09	0.073	81
Cys B361	0.92	0.60	65
Cys B380	2.13	1.58	74
Cys B9	0.62	0.55	89
Cys A86	0.33	0.045	14
Cys B112	0.57	0.49	86
Cys B201	0.68	0.196	30

Cuando se estudió el efecto de la concentración de 7-ACA (núcleo β -lactámico) en la *Tasa s/h1* de estos derivados, rigidificados en presencia de metanol, durante la síntesis del precursor del cefamandol en ausencia de metanol, se pudo observar como cuando la rigidificación en presencia de metanol fue llevada a cabo por la posición B380 (zona del centro activo), la enzima mostró los valores más altos de *Tasa s/h1* a todas las concentraciones de 7-ACA estudiados (Figura 5.28). Entre el resto de los mutantes no hubo diferencias significativas en los valores de *Tasa s/h1* (Figura 5.28).

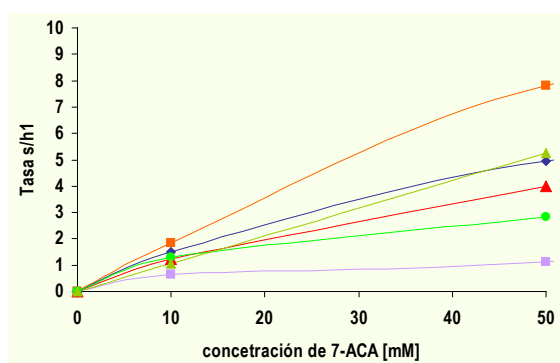


Figura 3.27. Efecto de la concentración de 7-ACA en la Tasa s/h1 de la síntesis del precursor del cefamandol con diferentes mutantes de PGA inmovilizados a pH 7 en Gx-SH agarosa y rigidificados a pH 10 en presencia de metanol al 20%. (♦)Cys B9 (■) Cys B380 (▲) Cys B361 (●) Cys B112 (▲) Cys B201 (■) PGA nativa. La reacción fue llevada a cabo con una concentración fija de R-Mandelato de Metilo 10 mM en fosfato de sodio 25 mM pH 6.5 a 25°C. Más detalles en sistema acuoso en Métodos 4.14

Además el mismo resultado se observó cuando se estudió el efecto de la concentración de 7-ACA en el rendimiento máximo de síntesis, como cabía esperar el derivado rigidificado en presencia de metanol de PGA orientada por la posición B380 presentó los máximos rendimientos de síntesis a todas las concentraciones de 7-ACA estudiadas (Figura 5.29). Como en el caso anterior, el resto de los mutantes presentaron rendimientos similares para todas las concentraciones de 7-ACA estudiadas.

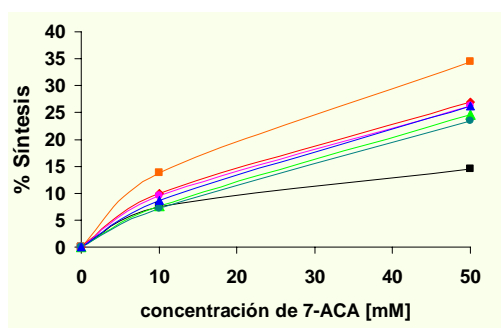


Figura 5.29. Efecto de la concentración de 7-ACA en el rendimiento de síntesis del precursor del Cefamandol con diferentes mutantes de PGA inmovilizados a pH 7 en Gx-SH agarosa y rigidificados a pH 10 en presencia de metanol al 20%. (♦) Cys B9 (■) Cys B380 (▲) Cys B361 (●) Cys B112 (▲) Cys B201 (◆) Cys A86 (■) PGA nativa. La reacción fue llevada a cabo con una concentración fija de R-Mandelato de Metilo 10 mM en fosfato de sodio 25 mM pH 6.5 a 25°C. Más detalles en sistema acuoso en Métodos 4.14

Sin embargo para ambos parámetros, *Tasa s/h1* y el rendimiento máximo, la enzima nativa inmovilizada-rigidificada en los mismos soportes y mismas condiciones (presencia de metanol) que todos los mutantes, mostró unos resultados mucho peores que todos los mutantes ensayados (Figuras 5.28 y 5.29). Las *Tasas s/h1* que mostró la enzima nativa rigidificada en presencia y ausencia de metanol fueron muy similares, e inferiores a las que mostró esta enzima cuando la reacción fue llevada a cabo en presencia de metanol. Sin embargo el mutante B380 rigidificado en presencia de metanol alcanzó una *Tasa s/h1* en ausencia del mismo incluso mayor a la que presentó el enzima nativa cuando en la reacción había metanol (Tabla 3.9)

Tabla 5.10. Tasa s/h1 en la síntesis del precursor del cefamandol de diferentes derivados de PGA en presencia y ausencia de Metanol 20% en la reacción.

Derivado	Enzima nativa*	Enzima nativa. Reacción en metanol 20%**	Enzima Cys B380 rigidificada en presencia de metanol 20%***
Tasa s/h1	0.79	1.41	2.2

* PGA nativa inmovilizada en Gx-SH agarosa y rigidificada a pH 10 en ausencia de metanol. Reacción 10 mM de 7-ACA, 10 mM MAME, 25°C y pH 6.5.

Resultados

** PGA nativa inmovilizada en Gx-SH agarosa y rigidificada a pH 10 en ausencia de metanol. Reacción 10 mM de 7-ACA, 10 mM MAME, metanol 20%, 25°C y pH 6.5.

*** PGA Cys B380 inmovilizada en Gx-SH agarosa y rigidificada a pH 10 en presencia de metanol 20%. Reacción 10 mM de 7-ACA, 10 mM MAME, 25°C y pH 6.5.

Una vez se descubrió la zona por la cual la rigidificación en presencia de metanol nos ofreció los mejores resultados en la síntesis del precursor del Cefamandol, nos dispusimos a hacer un análisis más exhaustivo del efecto que podría causar el metanol en la estructura de la enzima para lograr esta mejora. Primero se estudió si esta mejora en la *Tasa s/h1* es debida solamente a la orientación y rigidificación de una determinada zona, o si por el contrario fue debida a que el metanol indujo un cambio conformacional, el cual fue fijado en el proceso de rigidificación. De este modo el enzima conservaría las propiedades alteradas, resultado del cambio conformacional en su estructura terciaria.

Para llevar a cabo este estudio, se eligieron dos mutantes en los que la cisteína estuviera en dos zonas opuestas. Uno fue el mutante PGA B380, porque presentó las mejores propiedades en síntesis después de la rigidificación con metanol, además, en este mutante la cisteína está justo en el centro activo (Esquema 5.3). Por otro lado elegiremos el mutante PGA B9, el cuál presenta la cisteína justo en la cara opuesta del centro activo, por lo que *a priori* el centro activo no debe estar en contacto con la superficie del soporte, evitando la rigidificación y fijación de la conformación que éste pudiera adoptar en presencia de metanol(ESQUEMA 5.3).

En la figura 5.30 se puede observar como la *Tasa s/h1* apenas varió para el derivado inmovilizado-rigidificado en presencia y en ausencia de metanol del mutante PGA B9. Sin embargo el mutante PGA B380 rigidificado en presencia de metanol mostró una notable mejora en *Tasa s/h1* con respecto a su rigidificación en ausencia de metanol.

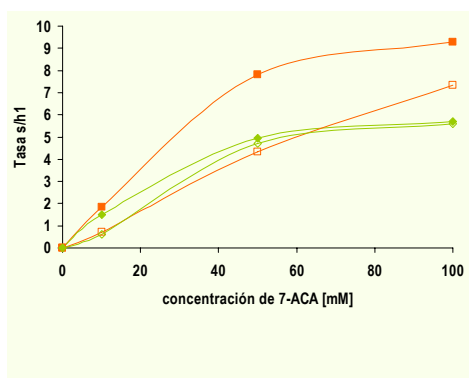


Figura 5.30. Efecto de la concentración de 7-ACA en la Tasa s/h1 en la síntesis del precursor del cefamandol con diferentes biocatalizadores de PGA inmovilizados y rigidificados en Gx-SH agarosa. (□)PGA cys B380 rigidificada en ausencia de metanol 20% (■)PGA cys B380 rigidificada en presencia de metanol 20% (△)PGA cys B9 rigidificada en ausencia de metanol 20%(◇)PGA nativa rigidificada en presencia de metanol 20% . La reacción fue llevada a cabo con una concentración fija de R-Mandelato de Metilo 10 mM en fosfato de sodio 25 mM pH 6.5 a 25°C. Más detalles en sistema acuoso en Métodos 4.14

Por lo tanto, se demostró que la gran mejora obtenida en la *Tasa s/h1* no fue debida solamente al efecto del metanol puesto que el mutante PGA B9 rigidificado en ausencia y presencia de metanol presentó unas curvas de saturación bastante similares (Figura 5.29). Por otro lado, la gran mejora, tampoco pudo ser debida, solamente, a la rigidificación de la zona, puesto que hasta 50 mM los mutantes PGA B9 y B380 rigidificados en ausencia de metanol presentaron valores similares de la *Tasa s/h1*, aunque a concentraciones más altas de 7-ACA si que parece que la orientación fue importante para lograr valores más altos de la *Tasa s/h1* (Figura 3.29).

Además, observando detenidamente la figura 5.30, se puede observar como parece que el mutante PGA B380 rigidificado en presencia de metanol alcanzó antes la saturación de 7-ACA, puesto que el aumento de la *Tasa s/h1* con la concentración de 7-ACA deja de ser proporcional a partir de 50 mM de 7-ACA, a menor concentración de 7-ACA que el mismo mutante rigidificado en ausencia de metanol. Sin embargo, la tendencia creciente de la *Tasa s/h1* que sigue el mutante PGA B380 rigidificado en ausencia de metanol pareció ser mucho más proporcional a la concentración de 7-ACA (Figura 3.29). Este resultado está sugiriendo que la rigidificación en presencia de metanol favorece la adsorción del núcleo antibiótico al centro activo, razón por la cual este biocatalizador presentó mejores propiedades sintéticas.

Para demostrar este efecto del metanol en el centro activo de estos derivados se llevó a cabo la inhibición con 7-ACA de la hidrólisis de NIPAB de los derivados rigidificados en ausencia y presencia de metanol del mutante B380. En primer lugar se observó que la inhibición del 7-ACA es acompetitiva (datos no mostrados) para la hidrólisis del NIPAB, pero lo más importante fue observar como a una concentración de 0.5 mM de 7-ACA, la actividad del derivado rigidificado en presencia de metanol fue del 68% de la actividad que presentó el derivado en ausencia de 7-ACA, mientras que a la misma concentración de inhibidor, el derivado rigidificado en ausencia de metanol presentó un 95% de la actividad en ausencia de inhibidor (Figura 5.31).

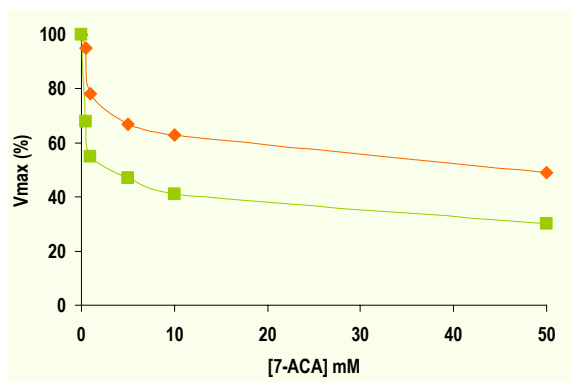


Figura 5.31. Efecto del 7-ACA en la hidrólisis de NIPAB llevada a cabo por diferentes derivados de PGA. (■) PGA Cys B380 inmovilizada en Gx-SH agarosa y rigidificada en presencia de metanol 20% a pH 10 (♦) PGA Cys B380 inmovilizada en Gx-SH agarosa y rigidificada en ausencia de metanol 20% a pH 10. La hidrólisis de NIPAB fue llevada a cabo según Métodos 4.2 en presencia de diferentes concentraciones de 7-ACA (0.5, 1, 5, 10 y 50 mM)

Además, la K_i del 7-ACA fue casi tres veces mayor (Tabla 5.11) para el derivado rigidificado en ausencia de metanol que para el derivado rigidificado en presencia de metanol. Este resultado volvió a sugerir que el metanol conduce a una conformación de la enzima más favorable para la adsorción del 7-ACA al centro activo.

Tabla 5.11. Inhibición del 7-ACA en la hidrólisis de NIPAB de derivados de PGA Cys B380 inmovilizados en Gx-SH-agarosa y rigidificados en presencia y ausencia de metanol. Las reacciones se llevaron a cabo con diferentes concentraciones de 7-ACA, pH 7.5, 25°C. Las actividades se midieron según Métodos 4.2

Rigidificación en presencia de Metanol 20%	K_i (mM)
No	3.4
Si	1.2

5.5.2. Síntesis Cinéticamente Controlada (SCC) en sistemas bifásicos.

Un gran inconveniente que tiene la SCC es la hidrólisis del antibiótico sintetizado como se describió al principio del punto 5.5. Por lo tanto la *Tasa s/h^2* también será muy importante para determinar el rendimiento final.

El problema de la *Tasa s/h^2* podría ser solucionado usando sistemas bifásicos, donde el producto final (antibiótico) quede en una fase distinta a la fase donde la enzima lleva a cabo la catálisis, evitando de este modo la posible hidrólisis del antibiótico (h^2)(Figura 1.21). En la

bibliografía se han descrito varios sistemas bifásicos (Heznadez-Justiz y col., 1998; Terreni y col., 2005b), de los cuales el sistema bifásico descrito por Terreni y col., 2005b, consiguió unos excelentes resultados para la síntesis del precursor del cefamandol. Este sistema bifásico consistió en una mezcla de dos fases, una formada por una disolución de sulfato de amonio 4M y pH 6.5 y la otra estaba formada por una disolución de polietilenglicol con un peso molecular de 600 Da (PEG 600) al 80% en agua destilada, el pH final de esta mezcla se ajustó a 6.5. Si nos fijamos en la fase del sulfato de amonio podemos observar que la concentración es muy alta, y en el apartado 5.5.1, b) se observó que con una concentración 2M de sulfato de amonio la *Tasa s/h1* disminuía notablemente (Figura 5.27). Por lo tanto con este sistema tendremos la ventaja de mejorar la *Tasa s/h2* pero como efecto opuesto tendremos un efecto negativo sobre la *Tasa s/h1* debido a la alta concentración de sulfato amonio en la fase donde se produce la catálisis enzimática. Para disminuir un poco este efecto negativo se llevó a cabo la síntesis del precursor del Cefamandol en el mismo sistema bifásico, con la diferencia de que la concentración de sulfato de amonio fue de 3M en vez de 4M como fue descrito en Terreni y col., 2005b. (Ver métodos 4.14)

Una vez establecido el sistema bifásico se llevaron a cabo diferentes reacciones de síntesis del precursor del cefamandol en este sistema y también en el sistema monofásico (10 mM de fosfato de sodio, pH 6.5).

Tabla 5.12. Tasa s/h1 y rendimiento de las reacciones de diferentes derivados de PGA en distintas condiciones de reacción

Enzima	Condiciones de reacción	Tasa s/h1	Rendimiento máximo (%)
Cys B9	Acuoso*	2.1	48
	Bifásico**	1.6	61
Cys B380	Acuoso*	4.4	58
	Bifásico**	2.3	69
Cys B380 con metanol 20%	Bifásico**	3.2	79
Cys B380 con metanol 20%	Bifásico ***	6.1	>90

* Condiciones de reacción sistema acuoso: Fosfato 10 mM, pH 6.5, 25°C
25 mM 7ACA/75 mM MAME

** Condiciones de reacción sistema bifásico: (NH₄)₂SO₄ 3M/Peg 80%(Bifásico), pH 6.5, 25°C
25 mM 7ACA/75 mM MAME

*** Condiciones de reacción sistema bifásico: (NH₄)₂SO₄ 3M/Peg 80%(Bifásico), pH 6.5, 25°C
50 mM 7ACA/150 mM MAME

En primer lugar se analizó el efecto en el rendimiento y en la tasa *Tasa s/h1* del sistema bifásico para los derivados de los mutantes PGA B9 y B380 rigidificados en ausencia de metanol (Tabla 5.12).

Se puede observar que tanto la mejora en rendimiento como la bajada en la *Tasa s/h1* cuando se utilizó el sistema bifásico, en contraposición a lo que ocurrió utilizando el sistema monofásico, este hecho ocurrió para ambos mutantes. Por lo tanto el sistema bifásico no afectó de forma distinta a los diferentes mutantes aunque la orientación de éstos en el soporte fuera justamente la opuesta.

Por otro lado cuando se usó el sistema bifásico con concentraciones de 25 mM 7-ACA y 75 mM de MAME y como catalizador se usó el mutante PGA B380 rigidificado en presencia de metanol, el rendimiento máximo fue del 79%(Tabla 5.12). Incluso este rendimiento puede ser aumentado hasta el 90% llevando a cabo la reacción con 50 mM de 7-ACA y 150 mM de MAME en condiciones del sistema bifásico (Tabla 5.12)

De este modo hemos pasado de un rendimiento del 49% a otro del 90%, eligiendo la mejor orientación para la distorsión con metanol, optimizando el medio de reacción mediante un sistema

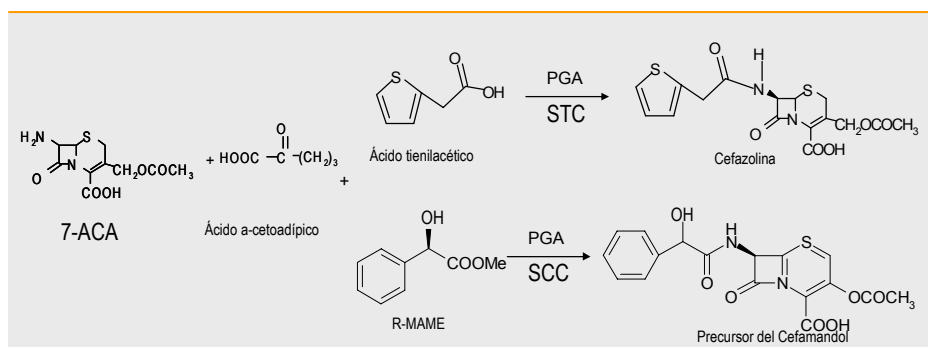
que nos impida la hidrólisis del producto final y aumentando la concentración de los sustratos iniciales.

5.6 Transformación de Cefalosporina C en Cefalosporinas semi-sintéticas.

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado la capacidad para llevar a cabo la conversión de CFC en 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno, además se han mejorados los parámetros sintéticos de la PGA para llevar a cabo la SCC del precursor del Cefamandol. De este modo combinando los logros obtenidos en los apartados 5.2 y 5.5, nos propusimos lograr cefalosporinas semi-sintéticas a partir de una sal de CFC, mediante una ruta totalmente enzimática y sin pasos de purificación intermedios.

Por un lado, se llevó a cabo la STC de cefazolina, según se describe en Fernández-Lafuente y col., 1996a, a partir del 7-ACA resultante de la conversión de CFC con el sistema trienzimático en ausencia de peróxido de hidrógeno y del ácido tienil-acético (Esquema 5.5). Además se llevó a cabo la SCC del precursor del Cefamandol con el 7-ACA proveniente del sistema anteriormente citado y con (S) mandelil metil éster.

Esquema 5.5. Síntesis de Cefazolina y del precursor del Cefamandol desde el 7-ACA producido mediante el sistema en ausencia de peróxido de hidrógeno.



En el caso de la STC, el 7-ACA, producto de las reacciones de deaminación oxidativa de CFC e hidrólisis del α -cetoadipil 7-ACA acopladas en un solo reactor en ausencia total de peróxido

de hidrógeno, fue mezclado con ácido tienil-acético en las condiciones descritas en Métodos 4.13. Tanto la velocidad de esta reacción como el rendimiento final de la misma fueron muy similares a los valores presentados por la reacción cuando esta fue llevada a cabo en las mismas condiciones, usando el 7-ACA resultante del proceso enzimática de hidrólisis de CFC en presencia de peróxido de hidrógeno y posteriormente purificado (Figura 5.32). La única diferencia entre ambas reacciones es la pureza del 7-ACA. En el primer caso la solución de 7-ACA viene acompañada de la misma concentración de α -cetoadípico que de 7-ACA, por el contrario en el otro caso la pureza del 7-ACA es bastante alta (>90%).

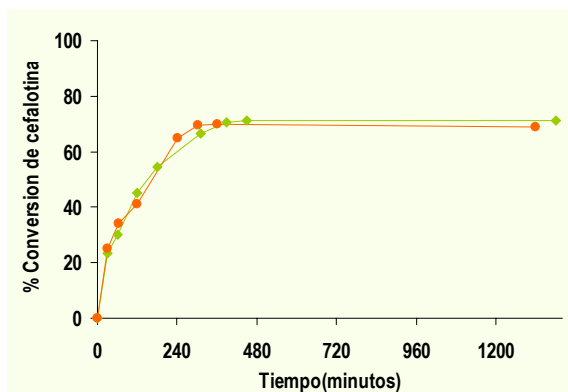


Figura 5.32. Síntesis Termodinámicamente Controlada de Cefalotina. La reacción se llevó a cabo con 12.5 mM de 7ACA puro (●) o 7-ACA más ácido α -cetoadípico (◆) en fosfato de sodio 0.1M pH 8, 40 mM de TAA, 50% Diglime. Ajustando el pH con una estrategia dinámica entre pH 7.1-6.5. Para más detalles ver Métodos 4.13

Por otro lado, cuando la SCC del ácido 7-[(1-hidroxi-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico (*intermediario en la síntesis del antibiótico Cefamandol*) se llevó a cabo con el 7-ACA proveniente de la deaminación oxidativa de CFC en ausencia de peróxido de hidrogeno en un sistema bifásico, tanto la Tasa s/h1 (6.1), como la hidrólisis del antibiótico y el rendimiento final del intermediario del antibiótico presentaron valores muy similares a los obtenidos con el 7-ACA purificado (Figura 5.33).

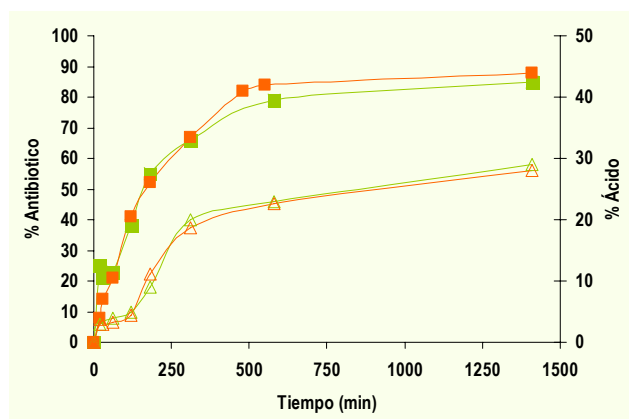


Figura 5.33. SCC con el 7-ACA resultante de la hidrólisis de CFC mediante Un sistema multienzimático en ausencia de peróxido de hidrogeno y sin Pasos de purificación. La reacción fue llevada a cabo con MAME 150 mM y 7-ACA 50 mM en condiciones bifásicas descritas más detalladamente en Métodos 4.14. Las condiciones de reacción fueron pH 6.5, 25° C. Ambas reacciones fueron llevadas a cabo con 0.5 UI/g. (■) Antibiótico y (△) Ácido sintetizados de la reacción usando el 7-ACA proveniente del sistema en ausencia de peróxido de hidrógeno (●) Antibiótico y (▲) Ácido sintetizados de la reacción usando el 7-ACA purificado

Por lo tanto, se puede llevar a cabo la síntesis directa de antibióticos semi-sintéticos desde la sal sódica de CFC obtenida de la fermentación de *Cephalosporium Acremonium* (Newton y Abraham, 1955) en dos reactores sin pasos de purificación intermedios y mediante el uso exclusivo de catalizadores biológicos, usando cualquiera de las dos estrategias descritas para este tipo de síntesis (STC o SCC)

6. DISCUSIÓN.

6.1 Desarrollo de nuevos biocatalizadores insolubles muy estables de GAC.

Las enzimas como biocatalizadores solubles, además de ser poco estables en la mayoría de las condiciones donde se llevan a cabo las biotransformaciones (salvo aquellas enzimas que procedan de organismos extremófilos) también generan un problema en la separación del producto final de la biotransformación. Por esto, es muy interesante la estabilización enzimática en forma insoluble, con esta estrategia se puede solucionar un problema físico, la baja estabilidad enzimática en condiciones de reacción y por otro lado se solucionaría un problema técnico, la separación de la enzima soluble de la mezcla de reacción, simplificando el diseño del reactor.

Por lo tanto, durante esta Tesis Doctoral, se han desarrollado diferentes estrategias para estabilizar la GAC, intentando desarrollar sistemas de estabilización simples, compatibles con el medio ambiente y donde la enzima no sea sometida a condiciones muy drásticas.

6.1.1 Estabilización de GAC mediante técnicas de inmovilización covalente multipuntual.

Existen numerosas técnicas de inmovilización para lograr una unión covalente multipuntual entre la enzima y el soporte. Ahora bien, la interacción del soporte y la enzima será más o menos intensa en función de diversas variables, como pueden ser; la superficie del soporte y la densidad de grupos reactivos de ésta que se encuentra la enzima al interaccionar con este soporte, la reactividad de los grupos del soporte y por supuesto la densidad de grupos superficiales de la enzima capaces de reaccionar con el soporte (Mateo y col, 2000a).

GAC se inmovilizó en diferentes soportes (agarosa o resinas epoxi-acrílicas) mediante diferentes químicas de inmovilización. Cabe destacar que en todos los casos las preparaciones inmovilizadas fueron más estables que la preparación soluble, por lo que aunque la rigidificación de la estructura terciaria de la enzima sea baja, se observó una mejora en la estabilidad enzimática.

Los mejores resultados en términos de estabilidad se obtuvieron cuando esta enzima se inmovilizó en Sepabeads EC-HFA (Figura 1.11) (Soportes con grupos amino cargados positivamente y epóxidos reactivos).

También se obtuvieron buenos resultados cuando GAC se inmovilizó en soportes activados con glutaraldehído. En estos soportes, debajo de cada grupo glutaraldehído, hay grupos amino secundarios cargados positivamente a pH 7.

En ambos mecanismos la inmovilización ocurrió en un sistema en dos etapas, una primera adsorción iónica muy rápida entre los grupos aminos del soporte, cargados positivamente al pH de inmovilización, y los grupos carboxilos de la superficie enzimática. A esta le siguió, una segunda etapa de unión covalente entre los nucleófilos existentes en la superficie enzimática y los grupos reactivos de los soportes; epóxidos en el caso de Sepabeads EC-HFA y aldehídos en el caso del soporte activado con glutaraldehído (Figuras 1.8 y 1.11). Esto sugirió, que la orientación a través de la zona más cargada negativamente de la superficie enzimática, jugó un papel crítico en la estabilidad del enzima, de forma que la posterior rigidificación por unión covalente de esta zona, mejoró bastante la estabilidad de la preparación inmovilizada con respecto a la preparación soluble.

Además, la mayor estabilidad del derivado de GAC inmovilizada en Sepabeads EC-HFA, en comparación con el derivado inmovilizado sobre soportes activados con glutaraldehído, puede ser debida, posiblemente a las mayores posibilidades de interacción entre los epóxidos del primer soporte y diferentes residuos de la superficie de la enzima. Puesto que el glutaraldehído es sólo capaz de reaccionar con el grupo ϵ -NH₂ de la cadena lateral de las lisinas (solo 9 lisinas en la superficie de la GAC) y otros aminos de bajo pK_a, como el amino terminal. Sin embargo, los epóxidos además de con los grupos anteriormente citados, los cuales son los más reactivos, también son capaces de reaccionar con el grupo imidazol de las histidinas e incluso con el grupo hidroxilo de las tirosinas en su forma desprotonada (10 residuos de tirosinas expuestas al medio).

Cabe resaltar los malos resultados obtenidos en términos de estabilidad con las preparaciones de GAC inmovilizadas sobre agarosa activada con grupos glioxiles. Además, la inmovilización de GAC en este soporte fue muy lenta (50% del enzima ofrecida en 4h de inmovilización). Estos resultados son difíciles de explicar si tenemos en cuenta que este soporte presenta excelentes propiedades para lograr una unión covalente multipuntual óptima entre la enzima y el soporte (Guisan, 1988; Mateo y col., 2006). Sin embargo, estos resultados pueden ser explicados basándonos en la estructura 3D de GAC resuelta por cristalografía de rayos X y depositada en el Protein Data Bank (PDB). Esta estructura muestra, que en toda la superficie del enzima no hay una zona rica en residuos lisina, de hecho sólo hay 8 residuos lisina expuestos al medio y muy dispersos en la estructura tridimensional. Esto generaría una pobre interacción entre el enzima y el soporte, traducándose en una baja estabilización de la enzima, puesto que la única posibilidad de unión covalente de los aldehídos del soporte Gx-agarosa con la enzima es a través

del grupo ϵ -NH₂ de las lisinas. De este modo, en esta enzima estaría muy dificultada la interacción de una zona altamente densa en grupos amino primario con el soporte. Debido a que las pocas lisinas superficiales no están concentradas en una zona capaz de interaccionar con el soporte, sino que están muy dispersas en toda la estructura tridimensional.

Una vez se determinó que la inmovilización en Sepabeads EC-HFA nos condujo a los mejores resultados en términos de estabilidad, se llevó a cabo una optimización del proceso de inmovilización de GAC sobre este soporte, con el objetivo de aumentar aún más la estabilidad del biocatalizador. Conociendo las propiedades potenciales de los grupos epóxido, capaces de reaccionar más eficientemente con gran número de aminoácidos de la superficie enzimática (lisinas, tirosinas, serinas, cisteínas e histidinas) a pH alcalino, el derivado, en el cuál GAC fue previamente inmovilizada sobre Sepabeads EC-HFA a pH 7 y 25° C, se incubó a pH 10 y 4° C durante 7 días. De este modo, la reactividad entre los epóxidos del soporte y los nucleófilos superficiales de la proteína fue mejorada, lográndose un gran aumento de la unión covalente multipuntual entre la enzima y el soporte. Este aumento en la interacción entre la enzima y el soporte se manifestó con un aumento de 15 veces en la estabilidad térmica de este derivado, comparándolo con el derivado sin incubar a pH alcalino, el cuál ya era bastante estable con respecto a la preparación soluble. Por lo tanto, la preparación óptima de GAC inmovilizada en Sepabeads EC-HFA e incubada a pH alcalino logró estabilizar esta enzima en torno a 250 veces, comparándola con la preparación soluble de la misma.

Como se puede desprender de los resultados obtenidos usando Sepabeads EC-HFA como soporte para la inmovilización de GAC, la orientación adquirida por esta enzima al adsorberse mediante intercambio iónico a soportes cargados positivamente es muy beneficiosa para la estabilidad enzimática. Además, también se pudo observar como la inmovilización a través de la química del glutaraldehído también nos proporcionó buenos resultados en términos de estabilidad térmica.

Basándonos en estos resultados y con el objetivo de diseñar una técnica de inmovilización-estabilización más sencilla y con menor consumo de tiempo, se propuso la combinación de la adsorción por intercambio iónico a soportes cargados positivamente con el entrecruzamiento covalente de enzimas previamente inmovilizadas (D'Souza y Kubal, 2002; Hwang y col., 2004).

En primer lugar, como otros autores habían descrito (Alonso, y col., 2004), y como se experimentó en el caso de la inmovilización en Sepabeads EC-HFA y soportes activados con

glutaraldehído, la adsorción mediante intercambio iónico, en este tipo de soportes cargados positivamente, era tan rápida que el 100% de la actividad ofrecida fue inmovilizada en menos de 15 minutos. Este hecho, posiblemente, sea debido al alto número de cargas negativas que tiene GAC en su superficie.

Cuando se estudió la estabilidad térmica que proporcionaban las diferentes estrategias capaces de llevar a cabo una unión covalente entre la enzima y el soporte, a través de la química del glutaraldehído, se observó que el entrecruzamiento con dicho agente bifuncional, posterior a la adsorción mediante intercambio iónico de la enzima, logró derivados enzimáticos más estables que aquellos donde la enzima fue inmovilizada directamente en un soporte donde su superficie había sido modificada con glutaraldehído. Este efecto no se observó solamente para GAC sino para otras enzimas. (D'Souza y Kubal, 2002; Hwang y col., 2004, López-Gallego, 2005c). Además este aumento en estabilidad no fue debido a la modificación química de la enzima con glutaraldehído, puesto que esta no generó un aumento de estabilidad, sino al entrecruzamiento entre los grupos amino del soporte y los del enzima a través de este agente bifuncional (Figura 1.8)

Debido a los buenos resultados obtenidos con esta estrategia, nos dispusimos a llevar a cabo una optimización de la misma. Se optimizaron diferentes parámetros como; el número de grupos amino primarios del soporte y la concentración de glutaraldehído en el tratamiento de entrecruzamiento. El derivado óptimo comprendió la adsorción mediante intercambio iónico de GAC en un soporte recubierto con polietilenimina de 600000 Da, posteriormente este derivado fue entrecruzado con una solución de glutaraldehído al 0.5% pH 7 y 25° C durante 1h.

Cabe reseñar que la concentración de glutaraldehído en el tratamiento fue un parámetro clave en la estabilidad final de las preparaciones inmovilizadas. Se observó que a concentraciones muy bajas (menores a 0.5%) no se consiguió alcanzar un buen grado de entrecruzamiento entre la enzima y el soporte, sin embargo cuando la concentración fue mayor a 0.65%, los resultados en estabilidad empeoraron. Este efecto, posiblemente, fue debido a que el entrecruzamiento, a concentraciones altas de glutaraldehído, entre la enzima y el soporte fue demasiado intenso, distorsionando la estructura terciaria de la proteína, perjudicando su estabilidad. Sin embargo, a concentraciones bajas, la cantidad de glutaraldehído en el medio pudo no ser suficiente para llevar a cabo un entrecruzamiento efectivo entre la enzima y el soporte, lo que llevó a una pobre rigidificación de su la estructura terciaria de la enzima, traduciéndose en la baja estabilidad que

presentaron los derivados. Además, se observó que después de este tratamiento el derivado fue bastante inerte, y la incubación a diferentes tiempos y a distintas temperaturas después del proceso de entrecruzamiento no tuvo ningún efecto en la estabilidad/actividad del derivado.

6.1.2. Propiedades de los mejores derivados inmovilizados de GAC. Comparación con las preparaciones comerciales.

Mediante dos técnicas completamente distintas, por un lado la inmovilización covalente sobre soportes heterofuncionales activados con grupos epóxidos y aminos cargados positivamente y posterior incubación a pH alcalino, el cuál aumentó la unión covalente multipuntual entre enzima y soporte, y por otro lado la adsorción mediante intercambio iónico sobre soportes cargados positivamente con aminos primarios y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído, se han logrado dos biocatalizadores muy estables de GAC en términos de estabilidad térmica. Esto implicaría que estos dos sistemas de inmovilización condujeron a una rigidificación de la estructura terciaria de la GAC, lo que permitió a esta enzima mejorar su estabilidad frente a la temperatura.

De hecho ambas preparaciones presentaron una estabilidad térmica bastante similar, siendo ésta mucho mayor que la estabilidad térmica de una preparación inmovilizada comercializada por Roche. Ambos derivados fueron entre 40 y 50 veces más estables que este derivado comercial.

Por otro lado, estos dos derivados presentaron diferentes resultados cuando se estudio la carga enzimática máxima por gramo de soporte. Mientras que el derivado de GAC inmovilizado en Sepabeads EC-HFA fue capaz de inmovilizar hasta 65 mg de proteína por gramo de soporte, (en torno a 85 UI/g después de la optimización), el derivado adsorbido mediante intercambio iónico en soportes recubiertos con polietileimina sólo fue capaz de adsorber 35 mg/g de enzima (en torno a 45 UI/g después del entrecruzamiento con glutaraldehído).

Esta diferencia en la capacidad de carga puede ser explicada por el tamaño de poro de cada uno de los soportes. El soporte Sepabeads EC-HFA tiene un área superficial en torno a 30 m²/g, mientras que el soporte recubierto con PEI tiene menos de 7 m²/g, debido a que la resina para sintetizar este soporte fue Sepabeads EC-EP3, cuyo tamaño de poro debe ser muy grande para poder albergar la cama de PEI. De este modo, el soporte Sepabeads EC-HFA pudo albergar más cantidad de proteína, puesto a que menor tamaño de poro mayor superficie por gramo de soporte,

implicando que una mayor cantidad de proteína por gramo de soporte puede ser inmovilizada, siempre que el tamaño de ésta sea inferior al diámetro del poro.

Otro aspecto muy importante a la hora de evaluar un derivado inmovilizado para uso industrial fue la resistencia mecánica. El derivado inmovilizado sobre Sepabeads EC-HFA se mostró mucho más resistente mecánicamente, tanto en agitación por palas rotatorias como por agitación magnética, que el derivado inmovilizado sobre soportes recubiertos con PEI. Este hecho, posiblemente, tiene que ver de nuevo con el tamaño de poro, puesto que los soportes con poros más pequeños son mucho más compactos, lo que les confiere una mayor resistencia mecánica. Aún así, el derivado inmovilizado en soportes recubiertos con PEI presentó valores de resistencia mecánica similares a los del derivado comercial, el que por supuesto fue muchísimo más frágil que el derivado inmovilizado sobre Sepabeads EC-HFA.

Por lo tanto, las dos preparaciones inmovilizadas desarrolladas para GAC presentaron sus ventajas y sus inconvenientes, partiendo de que con ambas estrategias se alcanzaron estabilizaciones similares. Mientras que el protocolo de preparación del derivado adsorbido mediante intercambio iónico sobre soportes recubiertos con PEI y posteriormente entrecruzado con glutaraldehído es mucho más simple y menos costoso en tiempo que el protocolo de inmovilización-rigidificación sobre Sepabeads EC-HFA, el derivado resultante de este último presentó una mayor capacidad de carga y una mejor resistencia mecánica. Dicho esto, no se puede olvidar que ambos derivados fueron muchos más estables, igual ó más resistentes mecánicamente, y uno de ellos igual de activo que el derivado comercial suministrado por Roche.

6.1.3. Aminación química de GAC. Una solución para lograr una unión covalente multipuntual intensa de GAC en soportes glioxil-agarosa.

La modificación química de proteínas ha sido una herramienta muy habitual para lograr estabilizar proteínas solubles (Gupta 1991; Wong y Wong 1992) o proteínas previamente inmovilizadas (Fernandez-Lafuente y col., 1992). A su vez, la inmovilización covalente multipuntual de proteínas se ha manifestado como una herramienta muy útil para lograr grandes estabilizaciones de multitud de enzimas (Martinek y col., 1977; Blanco y col., 1989; Mateo y col., 2000; Mateo y col., 2005b; Mateo y col., 2006).

Sin embargo, estas herramientas suelen utilizarse de manera independiente para lograr el mismo objetivo, la estabilización enzimática. En la presente Tesis Doctoral se propuso usar de manera combinada la modificación química de proteínas y la inmovilización covalente multipuntual. De este modo, llevaremos a cabo la modificación química de la enzima soluble (enriqueciéndola en grupos aminos primarios), no para mejorar su estabilidad, sino para mejorar el proceso de inmovilización covalente multipuntual, el cuál será el responsable de la estabilización enzimática.

Esta estrategia conjunta fue una excelente solución para enzimas como la GAC, con pocos residuos de lisina en su superficie, que tienen muchas dificultades para ser estabilizadas en glioxil-agarosa (soporte con excelentes propiedades para la unión covalente multipuntual (Guisan, 1988)), como fue explicado en el punto 4.1.1.

Ahora bien, la mejora de la inmovilización sólo fue posible logrando un aumento suficiente de grupos aminos en la superficie de GAC. Para esto, se controló la activación de los carboxilos superficiales con EDCI (controlando su concentración en el proceso). De este modo con 10^{-3} M de EDCI no se observaron mejoras en la velocidad de inmovilización con respecto a la enzima soluble, posiblemente, porque la cantidad de grupos carboxilos modificados fue tan pequeña que su efecto en la velocidad de inmovilización fue despreciable. Sin embargo cuando se logró una activación de en torno al 50% de los carboxilos superficiales del enzima (usando 10^{-2} M de EDCI), esta enzima fue inmovilizada rápidamente en glioxil agarosa (en la primera hora se inmovilizo más del 90% del enzima ofrecido), solucionando el primer problema que tenía la enzima no modificada, la cuál se inmovilizaba lentamente en estos soportes.

Pero el efecto del enriquecimiento en grupos aminos susceptibles de reaccionar con el soporte, no sólo se observó en la velocidad de inmovilización, sino también en la estabilidad enzimática, puesto que el derivado de la enzima modificada e inmovilizada en glioxil-agarosa fue 7 veces más estable que el mismo derivado de la enzima sin modificar.

6.1.4 Agregados proteicos en presencia de PEI. Estabilización de GAC sin soporte.

La agregación de GAC a diferencia de las demás no necesitó de ningún soporte para lograr la rigidificación de la estructura terciaria, en comparación con las otras técnicas usadas para la estabilización de esta misma enzima. Hasta la fecha hay muy pocas referencias bibliográficas sobre la agregación de esta proteína en particular, sin embargo sí que hay multitud de trabajos en los que

se estudia en profundidad esta técnica (Cao y co., 2000; Cao y col., 2001; Sheldon y col., 2001; López-Serrano y col., 2002; Schoevaart y col., 2004; Wilson y col., 2004a; Wilson y col., 2004b) para múltiples enzimas.

Una de las principales dificultades que presentó esta enzima, fue el bajo número de residuos lisina en su superficie, dificultando el entrecruzamiento de las proteínas agregadas, generando agregados entrecruzados poco estables tanto mecánica como térmicamente. De hecho, este problema se puso de manifiesto cuando la enzima fue precipitada solo en presencia de polietilenglicol (PEG) (CLEA-PEG), dando lugar a agregados con muy baja actividad expresada (Tabla 3.4) y muy baja estabilidad térmica.

En primera instancia, se pensó que esta baja actividad expresada fue debida a problemas difusionales de este tipo de agregados, sin embargo experimentos posteriores en los que se demostró la liberación de subunidades al medio bajo condiciones desnaturalizantes (Figura 3.13) de este tipo de agregados, puso de manifiesto que la baja actividad expresada. Este hecho, muy probablemente, fue debido a la pérdida de subunidades durante los lavados en el proceso de preparación de estos agregados.

Estos problemas fueron solucionados cuando la precipitación con PEG se llevó a cabo usando polietilenimina (PEI) (CLEA-PEIPEG) como agente co-precipitante. En este agregado, todas las moléculas de enzima estaban unidas covalentemente entre sí a través del agente entrecruzante, lo que mejoró tanto la actividad expresada como la estabilidad de estas preparaciones, en comparación con los agregados sin PEI.

Este hecho fue debido principalmente a que en ausencia de PEI el número de aminos primarios en la superficie de la enzima no es suficiente para lograr un entrecruzamiento efectivo entre todas las moléculas de enzima. Por lo tanto la enzima podría liberarse fácilmente del agregado en condiciones de altas temperaturas, comportándose como la enzima soluble, esto explicaría la baja estabilidad de estos agregados sin PEI (CLEA-PEG). Este hecho no ocurriría en los agregados precipitados en presencia de PEI (CLEA-PEIPEG), puesto que el polímero se podría entrecruzar con las moléculas de GAC. De este modo se prevendría la liberación del enzima y se conseguiría un entrecruzamiento multipuntual entre la PEI y la GAC, que resulto muy estabilizante.

Por lo tanto la combinación de PEI, GAC y glutaraldehído pareció ser una excelente estrategia para lograr la estabilización de GAC, al igual que ocurrió cuando GAC se inmovilizó mediante intercambio iónico en soportes cubiertos con PEI y posteriormente entrecruzados con glutaraldehído. Además la co-agregación de enzimas pobres en lisinas superficiales con polímeros cargados de amino grupos se presentó como una solución muy eficiente a la agregación de éstas, las cuáles no son capaces de formar agregados estables con el protocolo convencional (Cao y col., 2001; Sheldon y col., 2001)

Una vez se logró un método eficiente para obtener agregados estables en presencia de PEI, se optimizó el proceso de agregación y entrecruzamiento. En primer lugar, se estudió la importancia del PEG en el proceso de agregación. Se observó que la presencia de PEG en el proceso de agregación no fue solo importante para la agregación cuantitativa de la enzima en solución (Tabla 3.4), sino también para la estabilidad final del agregado, resultando estos agregados CLEA-PEIPEG más estables que los llevados a cabo solamente en presencia de PEI, sin PEG (CLEA-PEI). Además los agregados CLEA-PEIPEG retuvieron menos agua en su interior que los agregados CLEA-PEI. Posiblemente el PEG estaría ayudando a la generación de agregados más compactos, puesto que hay menos agua en su interior, lo que resultaría en agregados más rígidos, incrementando su estabilidad térmica.

Por otro lado, se observó que el momento de adición del glutaraldehído afectó a la estabilidad térmica final de los derivados. Cuando el glutaraldehído se adicionó justo después de mezclar la enzima con la PEI y antes de añadir el PEG, los resultados en términos de estabilidad fueron mejores que cuando el glutaraldehído se añadió al final del proceso de precipitación. Esto parece indicar que el entrecruzamiento entre GAC y PEI se ve más favorecido en ausencia de PEG, favoreciendo la rigidificación de la estructura terciaria.

Además, esta rigidificación tan alta no puede ser lograda solamente por la interacción iónica entre la enzima y la PEI (Alonso y col., 2004) y es necesario el entrecruzamiento covalente entre la GAC y la PEI a través de un agente bifuncional como es el glutaraldehído.

Por lo tanto estos nuevos biocatalizadores de GAC sin soporte fueron mucho más estables, exactamente 60 y 300 veces más, que el biocatalizador de GAC comercializado por Roche y la preparación soluble de esta enzima, respectivamente. Por tanto, estos biocatalizadores sin

soporte de GAC pueden competir en términos de estabilidad y/o actividad con los biocatalizadores de esta enzima inmovilizada sobre soportes Sepabeads EC-HFA o adsorbidos mediante intercambio iónico sobre soporte cubiertos con PEI y posteriormente entrecruzados con glutaraldehído.

De este modo se consiguieron 4 catalizadores muy estables de GAC combinando tres estrategias de estabilización diferentes (inmovilización covalente de proteínas, modificación química y agregación proteica) y tres químicas diferentes de interacción soporte- proteína ó proteína-proteína (a través de interacciones epóxido-amino, glutaraldehído amino y glioxil-amino). Todos estos preparados de GAC alcanzaron grandes factores de estabilización con respecto al enzima soluble (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Factores de estabilización de los mejores preparados de GAC desarrollados durante la presente tesis doctoral.

Preparado enzimático	Factor de estabilización*
Inmovilización-estabilización (pH 10, 7 días, 4° C) en Sepabeads EC-HFA	250
Inmovilización en Sepabeads-PEI y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído	204
Inmovilización de GAC 6-2 en Glioxil-agarosa	248
Co-agregación GAC-PEI en presencia de PEG y entrecruzamiento con glutaraldehído	300

*El factor de estabilización fue calculado mediante el cociente entre la vida media de cada uno de los preparados y la vida media de la enzima soluble, inactivados en las mismas condiciones

6.2. Conversión directa de Cefalosporina C a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno es uno de los principales inconvenientes en la producción de 7-ACA desde CFC, en sistemas que usan solamente DAAO y GAC como enzimas implicadas en el proceso. Principalmente DAAO se ve fuertemente inactivada en presencia de peróxido de hidrógeno (Dey y col., 1991; de la Mata y col., 2000), reduciendo notablemente la eficiencia del proceso a nivel industrial. En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un sistema en un solo reactor para llevar a cabo la conversión directa de CFC a 7-ACA sin aparición de productos secundarios usando un sistema multienzimático compuesto por dos biocatalizadores en los cuales están inmovilizadas 3 enzimas. En el primero DAAO y CATb están co-inmovilizados para llevar a cabo la deaminación oxidativa de CFC

y descomposición del peróxido de hidrógeno de forma simultánea, con el objetivo de evitar la acumulación de este último. El segundo biocatalizador consta de una sola enzima inmovilizada, la GAC, encargada de la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA, producto resultante de la deaminación oxidativa de CFC en ausencia de peróxido de hidrógeno, para generar el producto final de la biotransformación, el 7-ACA. Se demostró que durante todo el proceso no hubo aparición de peróxido de hidrógeno, puesto que no se formó nada de GL-7-ACA (producto resultante de la descarboxilación espontánea llevada a cabo por el peróxido de hidrógeno sobre el α -cetoadipil 7-ACA). Esto fue una gran ventaja con respecto al sistema convencional en dos reactores, donde no se eliminaba totalmente el peróxido de hidrógeno.

Además, otro problema del sistema en dos reactores en presencia de peróxido de hidrógeno, fue la acumulación de dos sustratos, el GL-7-ACA (mayoritario) y α -cetoadipil 7-ACA, después de la deaminación oxidativa de CFC en el primer reactor. El α -cetoadipil 7-ACA no pudo ser hidrolizado por GAC en el segundo reactor debido a la presencia de una alta concentración de ácido glutámico, proveniente de la hidrólisis del GL-7-ACA, sustrato mayoritario en el primer reactor y preferido por la GAC. El ácido glutámico es un potente inhibidor de la actividad α -cetoadipil 7-ACA acilasa. Este problema no ocurrió en el sistema en un solo reactor puesto que al no haber peróxido de hidrógeno no se pudo formar GL-7-ACA después de la deaminación oxidativa de CFC.

Por lo tanto, la conversión directa de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno, mediante un sistema tri-enzimático en un solo reactor presentó importantes ventajas con respecto al sistema convencional en dos reactores y en presencia de peróxido de hidrógeno. Las principales ventajas son:

- Mayor estabilidad de los catalizadores implicados en el proceso debido a la ausencia del peróxido de hidrógeno durante el mismo.
- No aparición de subproductos después de la deaminación oxidativa de CFC que disminuyen el rendimiento final de 7-ACA
- El desarrollo del proceso es mucho más simple y menos costoso, puesto que sólo es necesario el uso de un reactor.

Sin embargo, este sistema en un solo reactor podría ser mejorado si la velocidad de hidrólisis de GAC a través de α -cetoadipil 7-ACA fuera mayor. Este problema pudo ser solucionado

mejorando las propiedades catalíticas de esta enzima mediante técnicas de biología molecular y evolución dirigida.

Con el objetivo de mejorar la actividad de GAC a través del α -cetoadipil 7-ACA, se han evaluado diferentes mutantes de GAC de *Pseudomonas SY-77*. Estos mutantes son capaces de hidrolizar el adipil-7-ADCA mucho más rápido que la enzima nativa. Se tomó como parámetro para elegir los mutantes la velocidad de hidrólisis de adipil-7-ADCA porque es un sustrato estructuralmente muy parecido al α -cetoadipil 7-ACA, puesto que ambos tienen una cadena lateral con el mismo número de átomos de carbono, con la única diferencia del grupo carbonilo que tiene el α -cetoadipil 7-ACA en el carbono α (Figura 1.1)

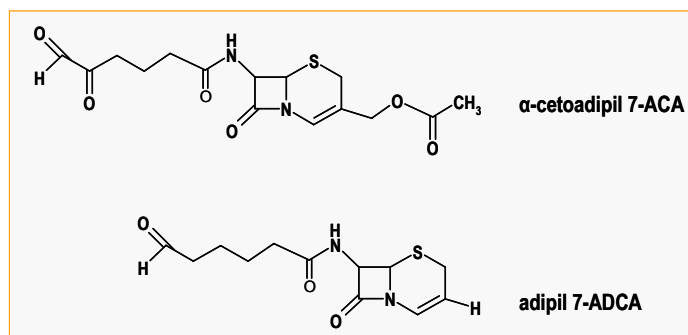


Figura 4.1. Estructura de α -cetoadipil 7-ACA y adipil 7ADCA. Estos dos sustratos tienen una cadena lateral alifática de la misma longitud (6 carbonos), con la única diferencia en el C α , que el α -cetoadipil 7-ACA tiene un grupo carbonilo, mientras que el adipil 7-ADCA no lo tiene.

De todos los mutantes estudiados podemos concluir que cuando las mutaciones afectaron al aminoácido 266, una asparragina en la enzima nativa, los parámetros cinéticos para la hidrólisis del α -cetoadipil 7-ACA, fueron incluso peores que los de la enzima nativa. Por el contrario, estudios de los mutantes seleccionados en esta posición, mostraron que estos hidrolizaron más rápido el adipil-7-ADCA que la enzima nativa (Otten y col., 2002). Por lo que parece, estos mutantes en la posición 266 favorecen una conformación del centro activo donde el acoplamiento de la cadena adipil es mucho mejor que el de la cadena α -cetoadipil, incluso fue mejor el acoplamiento de la cadena glutaril (Esquema 4.1). Una posible explicación a este hecho puede ser el importante papel que desempeña la posición 266 en la red de puentes de hidrógenos formados entre el sustrato y el centro activo del enzima para lograr una correcta interacción entre la arginina 255 y el carboxilo de la cadena alifática del sustrato, durante la catálisis (Otten y col., 2002). Por lo tanto, la nueva red de puentes de hidrógeno debida al cambio de la Asn por una His en esta posición pareció ser muy

favorable para la interacción entre el enzima y el adipil-7-ADCA, pero muy desfavorable para la interacción con el α -cetoadipil 7-ACA. Este hecho podría ser debido al grupo carbonilo en posición α del α -cetoadipil 7-ACA, puesto que al tener un oxígeno extra, en comparación con el adipil-7-ADCA, podría requerir una red de puentes de hidrógeno diferente a la que obtenemos con el mutante N266H.

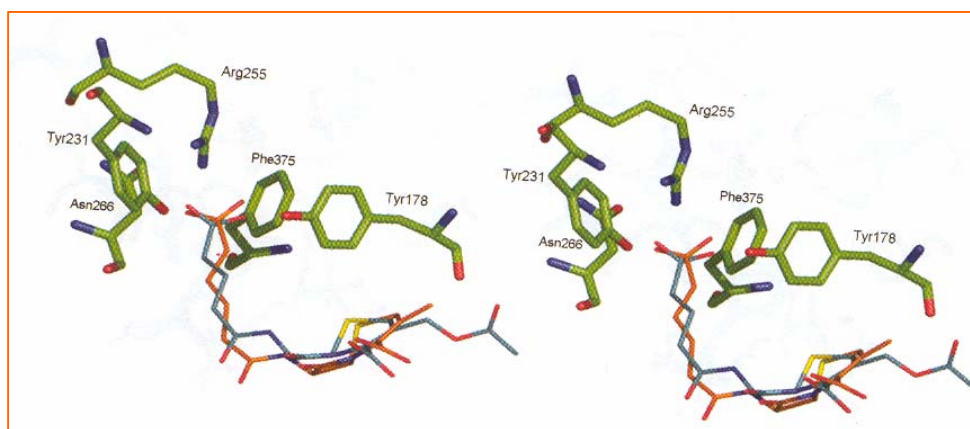


Figura 4.2. Disposición tridimensional de diferentes aminoácidos implicados en el reconocimiento del sustrato en el centro activo de GAC de *Pseudomonas* SY-77. Se representa la estructura de las cadenas laterales de adipil 7-ADCA (azul) y de glutaril 7-ACA (naranja) en el centro activo. Los residuos representados parecen ser importantes para ajustar la posición del carboxilo del sustrato en el centro activo. Los gráficos fueron creados con el programa PyMOL.

Por el contrario, los mutantes donde se cambió la posición 178 mejoraron bastante su actividad α -cetoadipil 7-ACA hidrolasa con respecto al enzima nativa. El cambio de una Tyr por una His en esta posición condujo a una mejora en la actividad adipil-7-ADCA hidrolasa (Figura 4.3) (Sio y col., 2002), posiblemente, debido a que la mutación por un aminoácido más pequeño e hidrofílico permitió un espacio mayor en el bolsillo de unión del sustrato facilitando el acomodo de una cadena alifática mas larga, dejando en una mejor posición a la serina catalítica con respecto al enlace amido del sustrato, para llevara a cabo la catálisis.

Esta explicación podría ser válida para comprender la mejora 1.7 y 3.3 veces la K_m y K_{cat} respectivamente en la hidrólisis α -cetoadipil 7-ACA con este mutante. Sin embargo, esta misma mutación Y178H se mostró ineficiente cuando se combinó en un doble mutante con la mutación N266H, que tan malos resultados mostró para la hidrólisis de α -cetoadipil 7-ACA. El doble mutante

fue incluso peor que el mutante simple N266H, por lo que parece que dos residuos de His cerca del carboxilo de la cadena alifática son contraproducentes.

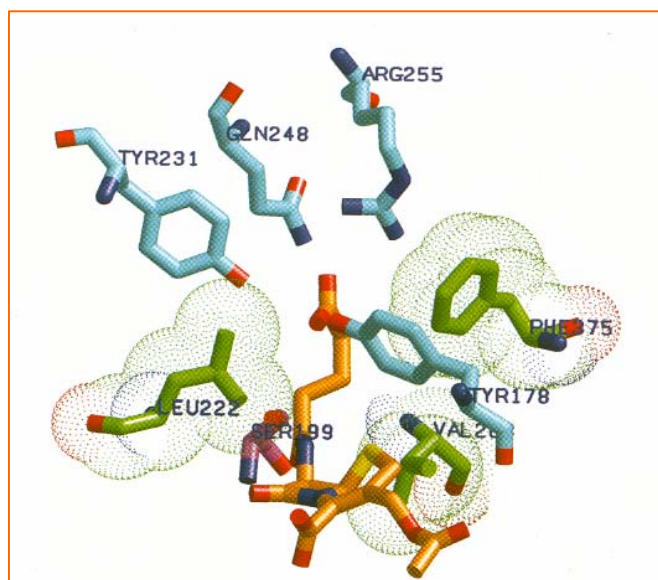


Figura 4.2. Disposición tridimensional de diferentes aminoácidos implicados en el reconocimiento del sustrato en el centro activo de GAC de *Pseudomonas* SY-77. Se representa la estructura de glutaril 7-ACA (naranja) en el centro activo. Se representan en verde forman una estructura parecida a un anillo hidrofóbico encargado de estabilizar la cadena alifática del sustrato. Los residuos en azul representan los residuos implicados en la interacción con el carboxilo del sustrato. La Ser catalítica esta representada en magenta. Los gráficos fueron creados con el programa PyMOL.

Los mejores resultados respecto a la hidrólisis del α -cetoadipil 7-ACA se obtuvieron con un doble mutante (Y178F/F375H), el cual fue obtenido mediante una método de mutagénesis al azar de las posiciones más importantes en la interacción enzima-sustrato diseñadas racionalmente (Sio, 2005). Se describió que la mutación simple en la posición 375 por un residuo más pequeño, como es la His, generó un espacio extra en el bolsillo de unión que facilitó el acomodo de la cadena adipil en el centro activo (Otten y col., 2002). Sin embargo, en el doble mutante, donde el aminoácido hidrofóbico de la posición 178 se cambió por otro de similares características (Y178F), y el hidrofóbico de la posición 375 se cambió por uno más pequeño e hidrofílico (F375H), la mejora en los parámetros cinéticos para la hidrólisis del α -cetoadipil 7-ACA, pudo ser debida a dos efectos que podrían ocurrir de forma simultanea, la mejor adaptación de la cadena alifática del α -cetoadipil 7-

ACA a la nueva red de puentes de hidrógeno formada por este mutante y a un mayor espacio en el bolsillo hidrofóbico para alojar la cadena α -cetoadipil.

Cabe destacar que este doble mutante Y178F/F375H presentó un valor de K_{cat} hacia el α -cetoadipil-7-ACA que significó el 40% de la K_{cat} de la enzima nativa hacia el GL-7-ACA, frente a la K_{cat} de la enzima nativa hacia el α -cetoadipil-7-ACA que solo significó el 5%. Esto implicó una importante mejora en la conversión directa de CFC a 7-ACA en ausencia de peróxido de hidrógeno.

Por esta razón se llevó a cabo esta biotransformación con este mutante, para observar si esta mejora en sus parámetros cinéticos se veía reflejada de igual modo durante el curso de la reacción. Se pudo observar que el sistema fue mejor en todos los casos con el mutante. De este modo se alcanzó la misma velocidad de producción de 7-ACA cuando se usó 3 veces menos en masa de proteína del doble mutante que de la enzima nativa. De este modo, para alcanzar los mismos resultados en velocidad de formación de 7-ACA se necesitaron 15 mg de GAC nativa por cada mg de DAAO frente a los 5 mg de GAC mutante (Y178F/F375H).

6.3. Estabilización orientada de la PGA en unos nuevos soportes bifuncionales glioxil-tiol.

La inmovilización orientada de enzimas es una herramienta muy interesante, puesto que nos ofrece la posibilidad de conocer cual sería la región exacta implicada en los determinados procesos de desestabilización enzimática. De este modo ya se han descrito protocolos de inmovilización-rigidificación orientada de enzimas, concretamente, un protocolo, que alcanzo muy buenos resultados, fue la inmovilización-rigidificación orientada de la PGA en soportes Eupergit C bifuncionales epóxido-tiol (Grazu, 2006). Sin embargo, también se describió que la naturaleza de este tipo de soportes Eupergit C presenta peores propiedades que los soporte Glioxil-agarosa para alcanzar una unión covalente multipuntual muy intensa entre la enzima y el soporte. Por este motivo se propuso sintetizar un soporte bifuncional agarosa glioxil-tiol, el cual presentó un mecanismo de inmovilización-rigidificación en dos etapas, una primera de inmovilización a pH neutro, a través del intercambio tiol-disulfuro entre los grupos sulfuro de la enzima y del soporte, y una segunda de rigidificación a pH alcalino entre los grupos ϵ -amino de las lisinas superficiales del enzima y los grupos glioxil del soporte. Se demostró que la etapa de rigidificación es necesaria para conseguir una rigidificación de la estructura terciaria del enzima, lo que se traduce en una mejora de estabilidad de estos derivados rigidificados a pH 10, con respecto a los que solamente fueron inmovilizados a

pH 7 en este tipo de soportes. Sin embargo se pudo observar como en la primera etapa de inmovilización se lograron algunos enlaces covalentes entre los aminos del enzima y los glioxiles del soporte, puesto que no toda la actividad inmovilizada en la primera etapa puede ser desorbida en presencia de Di-tiotreitol, agente capaz de reducir los enlaces disulfuro entre la enzima y el soporte. Ni siquiera, toda la enzima inmovilizada pudo ser desorbida en las condiciones desnaturizantes a las que fueron sometidos los derivados en el análisis electroforético SDS-PAGE.

De todos los mutantes estudiados la inmovilización-rigidificación en estos nuevos soportes a través de los residuos B201 y B380 mostraron las mejores estabilidades frente a disolventes orgánicos. La rigidificación de estas dos zonas pareció prevenir la estabilidad frente a disolventes orgánicos, por lo tanto muy posiblemente estas dos zonas se vean muy afectadas por el disolvente orgánico y su rigidificación evitaría el efecto de este.

Por lo tanto se ha conseguido un mutante de PGA que inmovilizado-rigidificado de forma orientada en estos nuevos soportes bifuncionales glioxil-tiol, el cual logró una estabilidad frente a disolventes orgánicos mucho mayor que la enzima nativa inmovilizada en el mismo soporte. Este aumento en la estabilidad frente a disolventes orgánicos es muy importante en la Síntesis Termodinámicamente Controlada de antibióticos β -lactámicos, puesto que podríamos usar mayores concentraciones de disolvente que se traducirían en un aumento del rendimiento final en la síntesis de estos.

6.4. Mejoras en la Síntesis de Cefalosporinas semi-sintéticas.

La síntesis enzimática de antibióticos semi-sintéticos es un proceso complejo que se puede llevar a cabo principalmente por dos estrategias, síntesis termodinámicamente controlada (STC) y síntesis cinéticamente controlada (SCC). El amplio estudio del uso de la PGA en reacciones de SCC de antibióticos β -lactámicos ha permitido concluir que tanto el medio de reacción como las modificaciones de la PGA pueden influir en las propiedades catalíticas de la enzima (Arroyo y col., 2003; Mateo y col., 2005a; Giordano y col., 2005.).

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la mejora de la *Tasa s/h1* de la SCC de un precursor del cefamandol, estudiando diferentes variables que puedan afectar a esta tasa.

6.4.1 Sistema de Inmovilización, una variable importante para el comportamiento en síntesis de la PGA.

En primer lugar se estudió el efecto de la estrategia de inmovilización en la *Tasa s/h1*, puesto que la reacción fue llevada a cabo con preparaciones inmovilizadas de PGA. Se han descrito varios métodos de inmovilización covalente multipuntual capaces de estabilizar la PGA (Guisan, 1988; Blanco y col., 1989; Mateo y col., 2002). La PGA fue inmovilizada en agarosa activada con bromuro de cianogeno (la enzima se orienta por el amino terminal), agarosa activada con glutaraldehído a baja fuerza iónica (posiblemente orientada por la zona más rica en cargas negativas (Betancor y col., 2006), agarosa activada con grupos glioxiles (posiblemente orientada por la zona más rica en residuos de lisina (Mateo y col., 2005b) y en Eupergit C (posiblemente orientada por la zona más hidrofóbica (Mateo y col., 2000a). Se pudo observar que la inmovilización en Eupergit C, tuvo valores de *Tasa s/h1* más bajos a todas la concentraciones de 7-ACA estudiadas que el resto de las preparaciones inmovilizadas, que se comportaron de forma similar entre las tres.

Posiblemente, la rigidificación de la zona a través de la cual se orientó la enzima (zona más hidrofóbica) provocó una distorsión de la enzima que afectó negativamente a la conformación del centro activo para la síntesis de antibióticos. Teniendo en cuenta estos resultados y los resultados previamente reportados para la estabilidad de estas preparaciones inmovilizadas, se eligió el derivado de PGA inmovilizado en agarosa activada con grupos glioxiles (Gx-agarosa) como biocatalizador para la SCC del precursor del cefamandol .

6.4.2 El medio de reacción puede influir en las propiedades sintéticas del catalizador

Por otro lado se estudió el efecto del medio de reacción en el valor de *Tasa s/h1*. Se observó que cuando la reacción fue llevada a cabo en presencia metanol, un disolvente orgánico polar, la *Tasa s/h1* fue mayor a la que presentó la reacción en las mismas condiciones pero sin metanol. Sin embargo cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de una alta concentración de sal, en este caso 2M de sulfato de amonio, la *Tasa s/h1* se vio disminuida. Este efecto tan positivo del metanol en la *Tasa s/h1* había sido previamente descrito (Kasche, 1985, Kasche; 1986, Fernandez-Lafuente y col., 1996b; Kim y col., 1996; Fernandez-Lafuente y col., 1998b). Sin embargo, las explicaciones del porque de este efecto no están muy claras, algunos autores relacionan este aumento en la *Tasa s/h1* con una menor hidrólisis aparente del éster por razones termodinámicas,

puesto que el metanol es uno de los productos de hidrólisis de los ésteres metílicos, frecuentemente usados en SCC (Kasche, 1985). Sin embargo otros autores defienden la hipótesis de los cosolventes orgánicos, en este caso el metanol, pueden interaccionar con zonas hidrofóbicas de la PGA distorsionando su estructura (Kim y col., 1996). De este modo la enzima podría sufrir cambios en su estructura terciaria, generando una conformación del centro activo distinta a la de la enzima en solución acuosa, variando las propiedades sintéticas de la enzima, mejorando la *Tasa s/h1*. Del mismo modo ocurriría a altas concentraciones de fuerza iónica, en este caso 2M de sulfato de amonio, donde las interacciones electrostáticas, como puentes salinos, se verían afectadas, pudiendo cambiar la estructura terciaria de la enzima y por tanto sus propiedades catalíticas (Kheirulomoom y col., 1998), en este caso se empeoraron la *Tasa s/h1*.

6.4.3 El metanol y su efecto en la estructura 3D de la PGA para mejorar las propiedades catalíticas de esta.

Una vez se observó la mejora del metanol en la *Tasa s/h1* y basándonos en los cambios conformacionales a los que se ve sometida la PGA en presencia de cosolventes orgánicos, se planteó el reto de congelar la distorsión sufrida por la PGA en presencia de metanol mediante la rigidificación covalente multipuntual dirigida de la zona que sufre dicha distorsión. El objetivo de este reto es tener una enzima que en ausencia de metanol conserve las buenas propiedades sintéticas que presentó en presencia de metanol.

Para determinar cuál zona fue la más afectada por el metanol se hizo un barrido de toda la superficie de la proteína, eligiéndose 6 zonas ricas en residuos lisinas. En cada una de ellas se introdujo una cisteína para inmovilizar y rigidificar de forma orientada cada una de las zonas. Puesto que el objetivo fue inmovilizar de forma orientada y conseguir una alta rigidificación de cada zona en presencia de metanol, se usaron los nuevos soportes de agarosa activada con grupos glioxiles y grupos tiol. De este modo, se pudo llevar a cabo la inmovilización orientada a pH neutro mediante intercambio tiol-disulfuro entre la enzima y el soporte, para posteriormente llevar a cabo la rigidificación en presencia de metanol de una zona específica mediante la interacción de las lisinas del enzima con los grupos glioxiles del soporte a pH alcalino.

Una vez los 6 mutantes y el enzima nativa fueron rigidificados en presencia de metanol, el mutante que tenía la cisteína en la posición B380, justo en el centro activo, fue el que consiguió la

Tasa s/h1 más alta de todos los mutantes estudiados en ausencia de metanol. Se obtuvieron los peores resultados en el caso de la enzima nativa rigidificada en presencia de metanol. Este hecho pudo ser debido a que la enzima nativa fue inmovilizada al azar, puesto que no tenía cisteínas por las que dirigir la orientación. Solo cuando se incubó en condiciones alcalinas esta enzima nativa logró inmovilizarse en este tipo de soportes, posiblemente a través de las zonas más ricas en residuos lisina (Mateo y col., 2005b). Así, la enzima nativa se podría orientar por diferentes zonas ricas en lisinas superficiales, resultando una mezcla de orientaciones, que en global no mostraron buenos resultados en términos de *Tasa s/h1*.

Por lo tanto de todas las zonas estudiadas, fue la rigidificación de la zona orientada por la posición B380 la que pareció fijar el cambio conformacional sufrido por la estructura terciaria de la enzima en presencia de metanol. Este hecho es lógico, puesto que la posición B380 está justo en el centro activo y ofrece un mejor plano de interacción con el soporte para lograr una mayor unión covalente multipuntual (Esquema 5.3). Con la rigidificación a través de esta orientación se consiguió “congelar” la estructura que adoptó la enzima en presencia de metanol, puesto que esta preparación presentó valores similares en *Tasa s/h1* en ausencia de metanol para la síntesis del precursor del cefamandol, que los que presentó la enzima rigidificada en ausencia de metanol cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de este.

Sin embargo, se podría pensar que la mejora de la *Tasa s/h1* no fue debida al efecto del metanol, sino a un efecto de la orientación, hecho que quedó descartado cuando se estudió la evolución de la *Tasa s/h1* de un derivado del mutante B380 rigidificado en ausencia de metanol, el cual mostró peores resultados para esta *Tasa s/h1* que el derivado del mismo mutante rigidificado en presencia de metanol.

Además también se demostró que muy posiblemente el metanol estaba interaccionando con el centro activo, provocando en éste unos cambios conformacionales capaces de mejorar la síntesis de antibióticos. Estos cambios, solamente, pudieron ser congelados mediante rigidificación covalente multipuntual de la zona inmovilizada a través de la posición B380. Debido a que el mutante B9, orientado por la cara opuesta al centro activo, no fue capaz de fijar estos cambios, ya que no hubo diferencia en el comportamiento de la *Tasa s/h1* entre el derivado rigidificado en presencia y el rigidificado en ausencia de metanol (Figura 3.28).

Esto podría indicar que cuando el centro activo quedaba muy lejos de la superficie del soporte, la fijación de la conformación 3D de éste en presencia de metanol se vio muy dificultada, volviendo a su conformación nativa en cuanto eliminamos el metanol del medio. Ésto no ocurría cuando el centro activo podía interaccionar directamente con el soporte, como ocurrió cuando se inmovilizó el mutante B380, quedando fijada la conformación distorsionada aún en ausencia del agente distorsionante.

6.4.4 Adsorción del núcleo antibiótico, la clave, el metanol

Hasta ahora solamente se ha hablado de que el metanol provoca un cambio conformacional en el centro activo que mejora la *Tasa s/h1* en la síntesis de antibióticos β -lactámicos. Sin embargo en ningún momento se ha explicado la razón por la cuál esta nueva conformación del centro activo fue capaz de mejorar la *Tasa s/h1*. Un primer indicio podría venir dado por el comportamiento de la *Tasa s/h1* a concentraciones crecientes de 7-ACA de los derivados del mutante B380 rigidificados en ausencia y presencia de metanol. Parece que la rigidificación en presencia de metanol necesitó una menor concentración de 7-ACA para alcanzar la *Tasa s/h1* máxima, que cuando la rigidificación fue llevada a cabo en ausencia de metanol. De este modo, el metanol podría estar favoreciendo la saturación del centro activo con el núcleo β -lactámico (7-ACA, en nuestro caso)

Además, este posible efecto del metanol en la adsorción del núcleo antibiótico se puso de manifiesto cuando se observó una mayor inhibición del 7-ACA en la actividad hidrolítica de NIPAB para los derivados rigidificados en presencia de metanol en comparación con los derivados rigidificados en ausencia de éste. Algunos autores han descrito que diferentes alcoholes, entre ellos el metanol, mejoran las propiedades catalíticas de algunas enzimas (Ohama y col., 1977; Gopalan y col., 1989) o son inhibidores de penicilin acilasas (Chilov y col., 2000). Particularmente, Arroyo y col., 2001 describieron que numerosos alcoholes produjeron un efecto estimulante en la actividad hidrolasa de la penicilina V acilasa, cuya estructura similar a la de la PGA. Estos autores describen que el alcohol genera un cambio conformacional en el centro activo, provocando una mejor interacción de éste con el sustrato. Incluso sugieren que podría haber un bolsillo hidrofóbico cerca del centro activo al que se podrían unir estos alcoholes.

Por lo tanto, parece ser que el metanol, ya sea por su hidrofobicidad o por su naturaleza de alcohol, podría interaccionar con el centro activo de la PGA provocando algún tipo de distorsión en este, la cuál favorecería la adsorción del 7-ACA a dicho centro activo, mejorando la *Tasa s/h1*. Solamente cuando llevamos a cabo la rigidificación orientada de esta zona en presencia de metanol somos capaces de congelar esta distorsión, logrando un derivado con propiedades sintéticas mejoradas debido al efecto del metanol, sin necesidad de llevar a cabo la reacción en presencia de este.

6.4.5 Hidrólisis del antibiótico, la solución del problema esta en dos fases.

Una vez mejoradas las propiedades del catalizador para la primera etapa de la reacción, se intentó llevar a cabo la reacción en condiciones donde apenas haya hidrólisis del antibiótico. La idea fue llevar a cabo la reacción en un sistema bifásico, de modo que los sustratos estén en una fase donde actué la enzima y el producto se vaya a otra fase donde no pueda actuar la enzima. Se han descrito varios sistemas bifásicos para diferentes antibióticos β -lactámicos en los que la diferencia entre los coeficientes de reparto de los sustratos y del antibiótico son muy diferentes (Hernandez-Justiz y col., 1998, Terreni y col., 2002). En esta Tesis Doctoral, se usó el sistema diseñado por Terreni y col., 2002 para la síntesis del precursor del cefamandol. Este sistema consta de una fase formada por sulfato de amonio 4M a pH 6.5 y otra fase formada por una solución al 80% de polietilenglicol (PEG) de 600 Da de peso molecular. Se introdujo una variante en este sistema, en la primera fase se disminuyó la concentración de sulfato de amonio hasta 3M, puesto que se sabía que la *Tasa s/h1* se veía disminuida por la presencia de concentraciones altas de esta sal. Ahora con este sistema donde los rendimientos aumentaron mucho debido a que no había hidrólisis del antibiótico (Terreni y col 2002), se observó que el catalizador rigidificado en presencia de metanol se comportó igual que el catalizador rigidificado en ausencia de metanol y que otro catalizador orientado por otra zona diferente. Se observó que en todos los casos este sistema bifásico ayudó a aumentar el rendimiento, y todos los biocatalizadores vieron disminuida su *Tasa s/h1* debido al efecto del sulfato de amonio. Una posible explicación a este efecto negativo del sulfato de amonio en la *Tasa s/h1* podría ser una mayor dificultad para establecer las interacciones electrostáticas entre el centro activo y el núcleo β -lactámico, disminuyendo la eficiencia de la síntesis.

Por lo tanto el rendimiento final de la SCC del precursor del cefamandol se ha ido mejorando mediante la optimización de diferentes variables que afectaban a este rendimiento. En primer lugar se eligió la mejor estrategia de inmovilización, después se observó que el metanol mejoraba las propiedades del catalizador en la síntesis, se buscó en que parte de la enzima se localizaba el efecto del metanol para lograr esa mejora, se consiguió congelar la conformación de esa zona en presencia de metanol, y finalmente dotando al catalizador de las propiedades mejoradas por el metanol en ausencia de este se llevó a cabo la SCC en un sistema bifásico (Figura 1.21) De este modo se ha pasado de un rendimiento del 32% con la enzima nativa en medio acuoso a uno del 80% con el derivado inmovilizado de forma orientada por la posición B380 de la PGA y rigidificado en presencia de metanol en un sistema bifásico en las mismas condiciones de concentración de sustratos, pH y temperatura. Incluso este rendimiento alcanza más del 90% cuando se aumentaron las concentraciones de los sustratos.

6.5. Obtención de Cefalosporinas semi-sintéticas desde Cefalosporina C mediante un proceso totalmente enzimático y sin pasos intermedios de purificación.

Una vez ha sido diseñado un proceso de producción de 7-ACA en el que se ha eliminado el peróxido de hidrógeno, uno de los mayores responsables de la inactivación enzimática en este proceso (Fernandez-Lafuente y col., 1999), lo ideal sería poder usar este sustrato directamente en la síntesis de antibióticos β -lactámicos, sin pasos de purificación. Para que esto sea posible, los productos secundarios formados durante la producción del 7-ACA, en este caso tendríamos ácido α -cetoadípico como principal producto secundario, no deberían interferir en la reacción de acilación de este 7-ACA llevada a cabo por la PGA.

Esto se puso de manifiesto para la SCC de Cefazolina puesto que el ácido α -cetoadípico no interfirió ni en la velocidad de síntesis de este antibiótico ni en el rendimiento final del mismo, por lo tanto no actuó ni como inhibidor ni afectó al equilibrio termodinámico de la reacción de síntesis.

En el caso de la SCC del ácido 7-[(1-hidroxí-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico (*intermediario en la síntesis del antibiótico cefamandol*), las diferentes velocidades implicadas en este complejo proceso (V_s , V_{h1} y V_{h2}) que determinan el rendimiento final de la reacción tampoco se vieron afectadas por ácido α -cetoadípico.

Este mismo hecho fue anteriormente puesto de manifiesto para un proceso de acilación del 7-ACA con PGA en presencia de otro ácido alifático (Terreni, M. y col., 2001). En este caso se usó el 7-ACA proveniente de la conversión enzimática de CFC en presencia de peróxido de hidrógeno para la síntesis del ácido 7-[(1-hidroxi-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico (*intermediario en la síntesis del antibiótico cefamandol*). De este modo, en esta solución tendremos 7-ACA y ácido glutámico en cantidades equimoleculares.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los ácidos alifáticos no afectan al modo de actuación de la PGA ni en STC ni en SCC de antibióticos semi-sintéticos.

De este modo, se pudo llevar a cabo la síntesis directa de antibióticos cefalosporánicos semi-sintéticos desde la sal sódica de CFC, obtenida de la fermentación de *Cephalosporium Acremonium* (Newton, G. G., and Abraham, E. P, 1955) en dos reactores sin pasos de purificación intermedios y mediante el uso exclusivo de catalizadores biológicos, usando cualquiera de las dos estrategias descritas para esta síntesis (STC o SCC). Se pudo observar como partiendo de un solo pico de CFC, usando 4 enzimas diferentes en 3 biocatalizadores, llegamos en dos pasos a un pico de antibiótico semi-sintético junto con el ácido (en el caso de STC) (Figura 4.5) o el éster y el ácido (en el caso de SCC) que no ha reaccionado. (Figura 4.6).

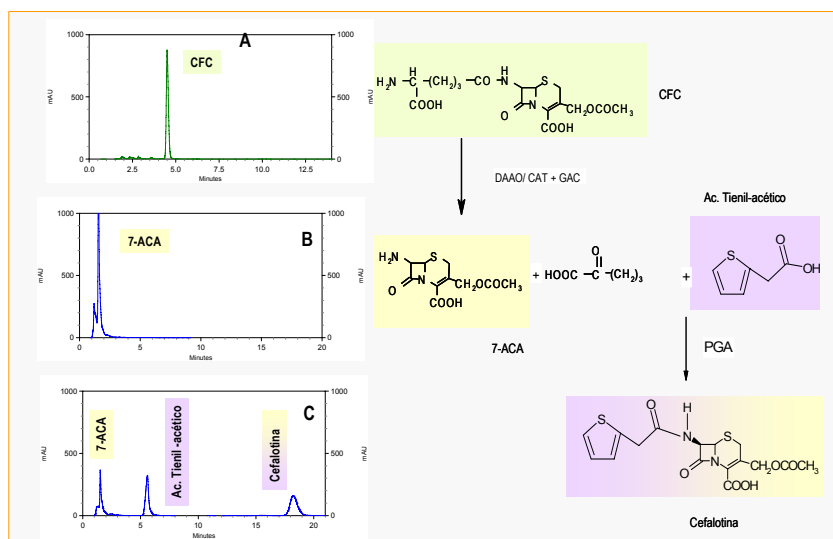


Figura 4.5. Analisis por HPLC de los diferentes sustratos y productos en la conversión de CFC a Cefazolina. Todos los picos fueron determinados a 210 nm en las condiciones de HPLC descritas en Métodos 2.11 para A) y en las condiciones Métodos 2.13 para B) y C).

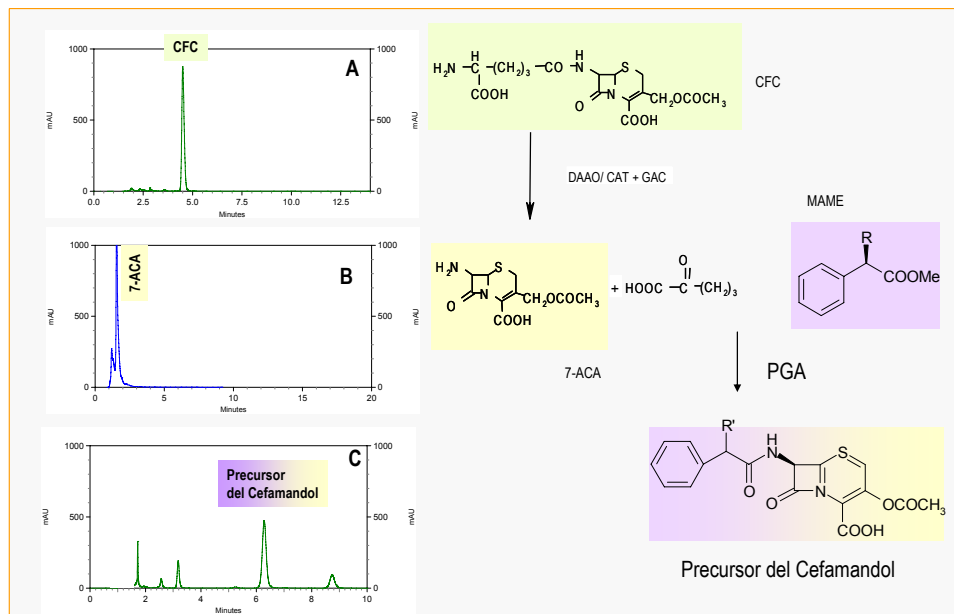


Figura 4.6. Analisis por HPLC de los diferentes sustratos y productos en la conversión de CFC a precursor del cefamandol. Todos los picos fueron determinados a 254 nm en las condiciones de HPLC descritas en Métodos 2.11 para A) y en las condiciones Métodos 2.13 para B) y C).

7. CONCLUSIONES.

1. Se ha logrado la estabilización de Glutaril acilasa (GAC) mediante inmovilización covalente multipuntual en un nuevo soporte heterofuncional, Sepabeads EC-HFA, optimizándose el proceso de inmovilización/rigidificación. De este modo inmovilizando la enzima a pH 7, durante 24 h y posteriormente incubando el derivado inmovilizado durante 7 días a 4° C, se ha logrado un biocatalizador 250 veces más estable que la preparación soluble.

2. Se ha logrado la estabilización de GAC mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído de derivados de esta enzima adsorbidos por intercambio iónico en soportes activados con grupos amino primario. Los mejores resultados se alcanzaron adsorbiendo la GAC en soportes Sepabeads EC-EP activados con polietilenimina (polímero hidrofílico policationico) y posteriormente entrecruzados con una solución de glutaraldehído al 0.5%, en condiciones de pH 7 y 25°C. Mediante este protocolo se logró estabilizar 204 veces la GAC, con respecto a la preparación soluble de esta.

3. Se ha logrado aumentar el número de grupos amino primario en la superficie de la GAC mediante la modificación química de esta, mejorando el proceso de inmovilización/estabilización de esta enzima en soportes de agarosa activada con grupos glioxiles. De este modo se lograron derivados de GAC modificada químicamente y posteriormente inmovilizada en soportes glioxil-agarosa 250 veces más estables que la preparación soluble de esta enzima.

4. Se ha desarrollado un protocolo para desarrollar agregados enzimáticos entrecruzados para proteínas que presenten bajo número de residuos lisinas en su superficie (como es el caso de la GAC), mediante la co-agregación de proteínas con polímeros ricos en aminos primarios. Además se ha mejorado el proceso de agregación usando polietilenglicol como agente precipitante en la formación de estos co-agregados. De este modo, se evitó la disolución de estos agregados en el medio de reacción, y además, este protocolo permitió estabilizar 300 veces la GAC en comparación con la preparación soluble de esta enzima.

5. Se ha desarrollado una nueva ruta, completamente enzimática, para la conversión de Cefalosporina C a 7-ACA en ausencia total de peróxido de hidrógeno, gracias a la presencia de una catalasa capaz de descomponer este reactivo. La catalasa fue co-inmovilizada con la D-aminoácido oxidasa para llevar a cabo la descomposición del peróxido de hidrogeno de una manera más efectiva. Por lo tanto este proceso implicó dos biocatalizadores distintos con tres enzimas distintas en un solo reactor. Con esta nueva ruta se lograron rendimientos de más del 80% de 7-ACA, mejorando la estabilidad de las enzimas implicadas en el proceso, gracias a la ausencia de peróxido de hidrógeno durante todo el proceso.

6. Se han construido mutantes de GAC mediante técnicas de mutagénesis dirigida y combinación al azar de mutaciones diseñadas racionalmente para mejorar la actividad de esta enzima hacia el sustrato α -cetoamidil-7-ACA, producto resultante de la deaminación oxidativa de la Cefalosporina C en ausencia de peróxido de hidrógeno. De todos los mutantes estudiados, el mutante doble Y178F/F375H presentó una eficiencia catalítica hacia este sustrato casi 20 veces mayor que la enzima nativa.

7. Se desarrollaron unos nuevos soportes bifuncionales agarosa glioxil-tiol, capaces de inmovilizar y rigidificar de forma dirigida los mutantes de PGA con una cisteína introducida genéticamente en diferentes zonas de su superficie. Cuando se inmovilizó la PGA en estos soportes de forma dirigida por el residuo B201, se logró una estabilización de 10 veces frente a disolventes orgánicos, con respecto a la inmovilización no orientada de la enzima nativa en estos mismos soportes

8. Se han mejorado la *Tasa s/h1* de la Penicilina G Acilasa (PGA) en la síntesis del ácido 7-[(1-hidroxí-1-fenil)-acetamido]-3-acetoximetil- Δ^3 -cefem-4-carboxílico (*intermediario en la síntesis del antibiótico cefamandol*), mediante la ingeniería del biocatalizador y la ingeniería del medio de reacción. Se pasó de una *Tasa s/h1* de 3 en tampón fosfato con un derivado de PGA nativa inmovilizado en Eupergit C a una *Tasa s/h1* de 6 cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de metanol al 20% y con un derivado de PGA nativa inmovilizado en Glioxil-agarosa.

9. Se logró “congelar” la conformación del centro activo de la PGA en presencia de metanol, mediante la inmovilización-rigidificación dirigida de la PGA por la posición B380 en los nuevos soportes bifuncionales. De este modo, se conservaron los efectos positivos que inducía el metanol en la Síntesis Cinéticamente Controlada (SCC), cuando la reacción se llevó a cabo sin metanol en el medio de reacción, pero el catalizador había sido rigidificado dirigidamente por la posición B380 en presencia de metanol. Además, se demostró que el metanol mejoró la adsorción del núcleo β -lactámico en el centro activo de la PGA.

10. Se logró llevar a cabo la síntesis de antibióticos cefalosporánicos semi-sintéticos desde Cefalosporina C, mediante un proceso totalmente enzimático en dos reactores y sin pasos de purificación intermedios, alcanzándose un rendimiento máximo de más del 80% para la síntesis del precursor del Cefamandol. Esto fue posible principalmente gracias a la mejora de todos los biocatalizadores implicados en el proceso completo, y a la mejora de los medios de reacción del proceso, sobre todo del medio de reacción en el que se desarrolla el paso de síntesis del antibiótico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abian, O., Grazu, V., Hermoso, J., Gonzalez, R., Garcia, J. L., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2004**. Stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. *Appl Environ Microbiol.* 70. 1249-51
- Abian, O., Wilson, L., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Re, D., Tam, A., Daminatti, M. **2002**. Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19-20. 295-303
- Abraham, E. P., Newton, G. G. **1961**. The structure of cephalosporin C. *Biochem J.* 79. 377-93
- Adani, S., Raimondi, S., Forti, S., Monti, S., Riva, S. **2005**. Enantioselective esterase activity of an industrial glutaryl acylase. *Tetrahedron.* 16. 2509-2513
- Aguirre, C., Toledo, M., Medina, V., Illanes, A. **2002**. Effect of cosolvent and pH on the kinetically controlled synthesis of cephalexin with immobilised penicillin acylase. *Proc. Biochem.* 38. 351-360
- Alfani, F. F. **1998**. Immobilized enzyme three-phase reactors for oxidation of Cephalosporin C. *Biocatalysis and biotransformation.* 16. 395-409
- Alkema, W. B., de Vries, E., Floris, R., Janssen, D. B. **2003**. Kinetics of enzyme acylation and deacylation in the penicillin acylase-catalyzed synthesis of beta-lactam antibiotics. *Eur J Biochem.* 270. 3675-83
- Alkema, W. B., Dijkhuis, A. J., De Vries, E., Janssen, D. B. **2002a**. The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase. *Eur J Biochem.* 269. 2093-100
- Alkema, W. B., Prins, A. K., de Vries, E., Janssen, D. B. **2002b**. Role of alphaArg145 and beta-Arg263 in the active site of penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem J.* 365. 303-9
- Alonso-Morales, N., Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2004**. Reversible immobilization of glutaryl acylase on sephabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnol. Progr.* 20. 533-536
- Alonso, J., Barredo, J. L., Diez, B., Mellado, E., Salto, F., Garcia, J. L., Cortes, E. **1998**. D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology.* 144 (Pt 4). 1095-101
- Alonso, N., Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **2005**. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *J Mol Catal B, Enzym.* 35. 57-61
- Alvaro, G., Fernandez-Lafuente, R., Blanco, R. M., Guisan, J. M. **1990**. Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 26. 181-95

- Alvaro, G. G., Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Blanco, R.M., Garcia-Lopez, J.L., Guisan, J.M. . **1992**. Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* new choice as industrial enzyme. *Biotechnol. Lett.* 14. 285-290
- Aramori, I. I. **1992**. Comparative characterization of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylases. *Journal of fermentation and bioengineering.* 73. 185-192
- Arroyo, M., de la Mata, I., Acebal, C.,Castillon, M. P. **2003**. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60. 507-14
- Arroyo, M., Torres-Guzman, R., Torres-Bacete, J., de la Mata, I., Pilar Castillon, M.,Acebal, C. **2001**. Kinetic mechanism of penicillin V acylase activation byshort-chain alcohols. *Enzym microb technol.* 29. 312-318
- Balcao, V. M., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Malcata, F. X.,Guisan, J. M. **2001**. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnol Prog.* 17. 537-42
- Barros, R. M., Extremina, C. I., Goncalves, I. C., Braga, B., O., Balcao, V. M.,Malcata, F. X. **2003**. Hydrolysis of [alpha]-lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzym microb technol.* 33. 908-916
- Basso, A., Braiuca, P., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P.,Benedetti, F. **2002**. GRID/tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1601. 85-92
- Batista-viera, F., Manta, C., Carlsson, J. . **1996**. Covalent binding of thiols to thiolsulphinat-containing supports. *Biotechnol. Appl. Biochem.* . 24. 231-239
- Batista-Viera, F. M., C. Carlsson, J. **1994**. Solid-phase thiolsulfonates for the reversible immobilization of thiols. *Biochem. Biotechnol.* . 44. 1-14
- Betancor, L., **2005**, Co-inmovilización y estabilización de oxidasas y catalasas. Aplicaciones biotecnológicas., UAM, Madrid, 29-33
- Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G. D.-O. C., Fernandez-Lafuente, R.,Guisan, J. M. **2006**. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology.* 39. 877-882
- Biffi, S., De Martin, L., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P. **2002**. Glutaryl-7-ACA acylase catalyses the synthesis of amide bond in heterogeneous substrate mixtures. *J. Mol Catal. B-Enzym.* 19-20. 135-141
- Blanco, R. M., Guisan, J.M. **1989**. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzym microb technol.* 11. 360-366
- Bommarus, A. S., Polizzi, K.M. **2006**. Novel biocatalysts: Recent developments. *Chemical engineering science.* 61. 1004-1016
- Bornscheuer, U. T.,Kazlauskas, R. J. **2004**. Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43. 6032-40

- Bradford, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72. 248-54
- Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R., Murzin, A. G. **1995**. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature.* 378. 416-9
- Brodelius, P., Nilsson, K., Mosbach, K. **1981**. Production of ketoacids. Part I. Immobilized cells of *Trigonopsis variabilis* containing D-aminoacid oxidase. *Appl Biochem. Biotech.* 6. 293-308
- Brotzu, C. G. **1948**. Recherché su di nuovo antibiotico. *Lav.Ist Igiene. Cagliari.*
- Burteau, N., Burton, S., Crichton, R. R. **1989**. Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. *FEBS Lett.* 258. 185-9
- Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G., Caccialanza, G. **2004**. Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. *J Pharm Biomed Anal.* 35. 243-58
- Cao, L., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. **2001**. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of [beta]-lactam antibiotics. *J Mol Catal B, Enzym.* 11. 665-670
- Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. **2000**. Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett.* 2. 1361-4
- Carlsson, J., Axen, R., Unge, T. **1975**. Reversible, covalent immobilization of enzymes by thiol-disulphide interchange. *Eur J Biochem.* 59. 567-72
- Carraway, K. L., Koshland, D. E., Jr. **1968**. Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents. *Biochim Biophys Acta.* 160. 272-4
- Conlon, H. D., Baqai, J., Baker, K., Shen, Y.Q., Wong, L., B., Noiles, R. Raush. W. **1995**. Two-step immobilized enzyme conversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 46. 510-513
- Crawford, L., Stepan, A. M., McAda, P. C., Rambosek, J. A., Conder, M. J., Vinci, V. A., Reeves, C. D. **1995**. Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity. *Biotechnology (N Y).* 13. 58-62
- Chilov, G. G., Guranda, D. T., Svedas, V. K. **2000**. The role of hydrophobic interactions on alcohol binding in the active center of penicillin acylases. *Biochemistry (Mosc).* 65. 963-6
- Choi, K. S., Kim, J. A., Kang, H. S. **1992**. Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *J Bacteriol.* 174. 6270-6
- D'Souza, S. F., Kubal, B. S. **2002**. A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. *J Biochem Biophys Methods.* 51. 151-9

- de la Mata, I., Ramon, F., Obregon, V., Castillon, M. P., Acebal, C. **2000**. Effect of hydrogen peroxide on d-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Enzym microb technol.* 27. 234-239
- Dey, E. S., Miller, J.R., Kovacevi, S., Mosbach, K. **1991**. Stabilization of D-aminoacid oxidase from yeast *Trigonopsis varibilis* used for production of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid from Cephalosporin C. *Appl Biochem. Biotech.* 27. 239-250
- Didziapetris, R., Drabnig, B., Schellenberger, V., Jakubke, H. D., Svedas, V. **1991**. Penicillin acylase-catalyzed protection and deprotection of amino groups as a promising approach in enzymatic peptide synthesis. *FEBS Lett.* 287. 31-3
- Diender, M. B., Straathof, A. J. J., van der Wielen, L. A. M., Ras, C., Heijnen, J. J. **1998**. Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin. *J Mol Catal B, Enzym.* 5. 249-253
- Done, S. H., Brannigan, J. A., Moody, P. C., Hubbard, R. E. **1998**. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase. *J Mol Biol.* 284. 463-75
- dos Reis-Costa, L., Soares, A. M., Franca, S. C., Trevisan, H. C., Roberts, T. J. **2003**. Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor. *Protein Pept Lett.* 10. 619-28
- Duggleby, H. J., Tolley, S. P., Hill, C. P., Dodson, E. J., Dodson, G., Moody, P. C. **1995**. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature.* 373. 264-8
- Dziezak, J. D. **1991**. Enzymes: catalysts for food processes. *Food Technol.,* 45. 78-85
- Ebert, C. C., Gardossi, L., Linda, O. **1996**. Control of enzyme hydration in penicillin amidase catalysed synthesis of amide bond. *Tetrahedron Lett.* 37. 9377-9380
- Elander, R. P. **2003**. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61. 385-92
- Faber, K., **1996**, Biotransformation in Organic Chemistry., Springer, New York, 345-356.
- Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., **1998**. Enzyme and protein engineering via immobilization and post-immobilization techniques. *Recent. Res. Devel. in Biotech Bioeng.* 1. 299-309
- Fernandez-Lafuente, R., Hernandez-Justiz, O., Mateo, C., Terreni, M., Fernandez-Lorente, G., Moreno, M. A., Alonso, J., Garcia-Lopez, J. L., Guisan, J. M. **2001**. Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions. *Biomacromolecules.* 2. 95-104
- Fernandez-Lafuente, R., Rodriguez, V., Guisan, J. M. **1998a**. The coimmobilization of -amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of -amino acids (-phenylalanine) into [alpha]-keto acids (phenylpyruvic acid). *Enzym microb technol.* 23. 28-33
- Fernandez-Lafuente, R., Rodriguez, V., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Arminsen, P., Sabuquillo, P., Guisan, J. M. **1999**. Stabilization of enzymes (-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 7. 173-179

- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Alvaro, G., Guisan, J. M. **1992**. Additional stabilization of penicillin G acylase-agarose derivatives by controlled chemical modification with formaldehyde. *Enzyme Microb Technol.* 14. 489-95
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Guisan, J. M. **1998b**. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized penicillin G acylase. *Enzym microb technol.* 23. 305-310
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Guisan, J. M. **1995**. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzym microb technol.* 17. 517-523
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., Guisan, J. M. **1993**. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb Technol.* 15. 546-50
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Guisan, J. M. **1996a**. Dynamic reaction design of enzymic biotransformations in organic media: Equilibrium-controlled synthesis of antibiotics by penicillin G acylase. *Biotechnol.appl. biochem.* 24. 139-143
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Piatkowska, B., Guisán, J. M. **1996b**. Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches. *Enzym microb technol.* 19. 9-14
- Fritz-Wolf, K., Koller, K. P., Lange, G., Liesum, A., Sauber, K., Schreuder, H., Aretz, W., Kabsch, W. **2002**. Structure-based prediction of modifications in glutarylaminidase to allow single-step enzymatic production of 7-aminocephalosporanic acid from cephalosporin C. *Protein Sci.* 11. 92-103
- Gabor, E. M., de Vries, E. J., Janssen, D. B. **2005**. A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzym microb technol.* 36. 182-190
- Gianfreda, L., Scarfi, M. R. **1991**. Enzyme stabilization: state of the art. *Mol Cell Biochem.* 100. 97-128
- Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., Wecke, J. **1998**. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62. 1371-414
- Giordano, R. C., Ribeiro, M. P. A., Giordano, R. L. C. **2006**. Kinetics of [beta]-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnol. Adv.* 24. 27-41
- Goncalves, L. R., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Giordano, R. L. **2000**. A kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose. *Appl Biochem Biotechnol.* 84-86. 931-45
- Goncalves, L. R., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Giordano, R. L., Giordano, R. C. **2003**. Inhibitory effects in the side reactions occurring during the enzymic synthesis of amoxicillin: p-hydroxyphenylglycine methyl ester and amoxicillin hydrolysis. *Biotechnol Appl Biochem.* 38. 77-85

- Goncalves, L. R., Sousa, R., Jr., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Giordano, R. L., Giordano, R. C. **2002**. Enzymatic synthesis of amoxicillin: avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. *Biotechnol Bioeng.* 80. 622-31
- Gopalan, V., Glew, R. H., Libell, D. P., DePetro, J. J. **1989**. The dual effects of alcohols on the kinetic properties of guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase. *J Biol Chem.* 264. 15418-22
- Grazu, V., **2006**, Estabilización de Penicilina G acilasa por inmovilización covalente multipuntual dirigida. Mutagénesis de la superficie de la enzima para mejorar la complementariedad enzima-soporte activado., UAM, Madrid, 121-141
- Grazu, V., Abian, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2005**. Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. *Biotechnol Bioeng.* 90. 597-605
- Gregory, M. A., Petkovic, H., Lill, R. E., Moss, S. J., Wilkinson, B., Gaisser, S., Leadlay, P. F., Sheridan, R. M. **2005**. Mutasynthesis of rapamycin analogues through the manipulation of a gene governing starter unit biosynthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44. 4757-60
- Guisan, J. M. **1988**. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzym microb technol.* 10. 375-382
- Gupta, M. N. **1991**. Thermostabilization of proteins. *Biotechnol Appl. Biochem.* 14. 1-11
- Hartmeier, W., **1988**, Immobilized biocatalyst. An introduction., Springer-Verlag., New York, 22-48 y 82-115.
- Henley, J. P., Sadana, A. **1984**. Series-type enzyme deactivation kinetics: influence of immobilization, chemical modifiers, and enzyme aging. *Ann N Y Acad Sci.* 434. 64-9
- Hermanson, G. T., **1996**, Bioconjugate Techniques., Academic Press, I., San Diego (California), 53-132.
- Hernandez-Justiz, O., Fernandez-Lafuente, R., Terreni, M., Guisan, J. M. **1998**. Use of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. *Biotechnol Bioeng.* 59. 73-9
- Hernandez-Justiz, O., Terreni, M., Pagani, G., Garcia, J. L., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **1999**. Evaluation of different enzymes as catalysts for the production of [beta]-lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy. *Enzym microb technol.* 25. 336-343
- Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R. J., Murshudov, G. N., Verma, C. S., Dodson, G. G., Wilson, K. S. **2000**. Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from Escherichia coli reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. *J Mol Biol.* 302. 887-98
- Hoare, D. G., Koshland, D. E., Jr. **1967**. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J Biol Chem.* 242. 2447-53
- Hodgkin, D. C., Maslen, E. N. **1961**. The x-ray analysis of the structure of cephalosporin C. *Biochem J.* 79. 393-402

- Huang, X., Zeng, R., Ding, X., Mao, X., Ding, Y., Rao, Z., Xie, Y., Jiang, W., Zhao, G. **2002**. Affinity alkylation of the Trp-B4 residue of the beta⁻-subunit of the glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase of *Pseudomonas* sp. 130. *J Biol Chem*. 277. 10256-64
- Hunt, P. D., Tolley, S. P., Ward, R. J., Hill, C. P., Dodson, G. G. **1990**. Expression, purification and crystallization of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Protein Eng*. 3. 635-9
- Hwang, S., Lee, K., Park, J., Min, B., Haam, S., Ahn, I., Jung, J. **2004**. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. *Biochem. Eng. J.* 17. 85-90
- Ichikawa, S. S. **1981**. *Agricultural and biological chemistry*. 45. 2231-2236
- Ignatova, Z., Enfors, S., Hobbie, M., Taruttis, S., Vogt, C., Kasche, V. V. **2000**. The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli**. *Enzyme Microb Technol*. 26. 165-170
- Illanes, A., **1994**, Biotecnología de enzimas., Valparaíso, E. u. d. I. U. C. d.,
- Illanes, A., Altamirano, C., Ruiz, A. **1996**. Stability of immobilized penicillin acylase under reactive conditions. *Ann N Y Acad Sci*. 799. 472-5
- Illanes, A., Wilson, L. **2003**. Enzyme reactor design under thermal inactivation. *Crit Rev Biotechnol*. 23. 61-93
- Ishii, Y., Saito, Y., Fujimura, T., Sasaki, H., Noguchi, Y., Yamada, H., Niwa, M., Shimomura, K. **1995**. High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176. *Eur J Biochem*. 230. 773-8
- Kasche, V. V. **1985**. Ampicillin- and cephalixin-synthesis catalyzed by *E. coli* penicillin amidase. Yield increase due to substrate recycling. *Biotechnol. Lett*. 7. 877-882
- Kasche, V. V. **1986**. Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products *Enzym microb technol*. 8. 4-16
- Kheirrolomoom, A., Ardjmand, M., Vossoughi, M., Kazemeini, M. **1998**. The stability analysis and modeling of pH- and ionic strength inactivation of penicillin G acylase obtained from various species of *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 2. 81-88
- Kim, J. K., Yang, I. S., Rhee, S., Dauter, Z., Lee, Y. S., Park, S. S., Kim, K. H. **2003**. Crystal structures of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase: insight into autoproteolytic activation. *Biochemistry*. 42. 4084-93
- Kim, J. K., Yang, I. S., Shin, H. J., Cho, K. J., Ryu, E. K., Kim, S. H., Park, S. S., Kim, K. H. **2006**. Insight into autoproteolytic activation from the structure of cephalosporin acylase: a protein with two proteolytic chemistries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103. 1732-7
- Kim, M. G. L., S.B. **1996**. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of β -lactam antibiotics in water-methanol mixtures: Effect of cosolvent content and chemical nature of substrate on reaction rates and yields *J Mol Catal B, Enzym*. 1. 201-211

- Kim, S., Kim, Y. **2001a**. Active site residues of cephalosporin acylase are critical not only for enzymatic catalysis but also for post-translational modification. *J Biol Chem*. 276. 48376-81
- Kim, Y., Hol, W. G. **2001b**. Structure of cephalosporin acylase in complex with glutaryl-7-aminocephalosporanic acid and glutarate: insight into the basis of its substrate specificity. *Chem Biol*. 8. 1253-64
- Kim, Y., Yoon, K., Khang, Y., Turley, S., Hol, W. G. **2000**. The 2.0 Å crystal structure of cephalosporin acylase. *Structure*. 8. 1059-68
- Klibanov, A. M. **1983a**. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv Appl Microbiol*. 29. 1-28
- Klibanov, A. M. **1983b**. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*. 219. 722-727
- Kramer, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Muller, U., Orf, S., Wubbolts, M., Raeven, L. **2003**. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng*. 5. 277-83
- Kuroiwa, T. T. S., H., Ichikawa, S., Sato, S., Mukataka, S. **2005**. Immobilization and stabilization of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* by a multipoint attachment method using activated agar gel supports. *Process Biochem*. 40. 2637-2642
- Kutzbach, C., Rauenbusch, E. **1974**. Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11 105. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiol. Chem*. 355. 45-53
- Laemmli, U. K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227. 680-5
- Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcao, V. M., Malcata, F. X. **2001**. Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzym microb technol*. 28. 642-652
- Li, Y., Chen, J., Jiang, W., Mao, X., Zhao, G., Wang, E. **1999**. In vivo post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas* sp. 130. *Eur J Biochem*. 262. 713-9
- Li, Y., Jiang, W., Yang, Y., Zhao, G., Wang, E. **1998**. Overproduction and purification of glutaryl 7-amino cephalosporanic acid acylase. *Protein Expr Purif*. 12. 233-8
- Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2005a**. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: a simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules*. 6. 1839-42
- Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **2004**. Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads. *J Biotechnol*. 111. 219-27
- López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2005**. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotech*. 119. 70-75

- Lopez-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **2005b**. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *J Biotechnol.* 116. 1-10
- Lopez-Gallego, F. B., L., Hidalgo, A., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. . **2005**. One-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid in the absence of hydrogen peroxide. *Adv. synth. catal.* 347. 1804-1810
- López-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R. **2002**. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. *Biotechnol. lett.* 24. 1379-1383
- Luk, Y. Y., Tingey, M. L., Dickson, K. A., Raines, R. T., Abbott, N. L. **2004**. Imaging the binding ability of proteins immobilized on surfaces with different orientations by using liquid crystals. *J Am Chem Soc.* 126. 9024-32
- Luo, H., Li, Q., Yu, H., Shen, Z. **2004**. Construction and application of fusion proteins of D-amino acid oxidase and glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase for direct bioconversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol Lett.* 26. 939-45
- Magnan, E., Catarino, I., Paolucci-Jeanjean, D., Preziosi-Belloy, L., Belleville, M. P. **2004**. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *J.Membr. Sci.* 241. 161-166
- Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R. **2000**. Site-specific and random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics. *Biotechnol Appl Biochem.* 32 (Pt 3). 189-95
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijssink, V. G., Ulbrich-Hofmann, R. **1999**. Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry.* 38. 8240-5
- Martinek, K., Klivanov, A. M., Goldmacher, V. S., Berezin, I. V. **1977**. The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochim Biophys Acta.* 485. 1-12
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2000a**. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*. *Enzyme Microb Technol.* 26. 509-515
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2000b**. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol Bioeng.* 68. 98-105
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Tam, A., Daminati, M. **2002**. Epoxy sephabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol Prog.* 18. 629-34
- Mateo, C., Abian, O., Grazu, V., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Fuentes, M., Segura, R.L., Montes, T., López-Gallego, Willson, L., Torres, R., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. **2005a**. Recent advances in the industrial enzymatic synthesis of semi-synthetic [beta]-lactam antibiotics. *Med. Chem. Rev. Online.* 2. 207-2018

- Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2000c**. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*. 1. 739-45
- Mateo, C., Palomo, J. M., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. **2004**. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnol Bioeng*. 86. 273-6
- Mateo, C., Torres, R., Fernandez-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., Lopez-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J. M., Betancor, L., Pessela, B. C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **2003**. Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*. 4. 772-7
- Mateo, C. C. A., O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2005b**. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzym microb technol*. 37. 456-462
- Mateo, C. C. P., J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B. C. C., Hidalgo, A., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2006**. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzym microb technol*. 39. 274-280
- Matsuda, A., Toma, K., Komatsu, K. **1987**. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol*. 169. 5821-6
- Mattevi, A., Vanoni, M. A., Curti, B. **1997**. Structure of D-amino acid oxidase: new insights from an old enzyme. *Curr Opin Struct Biol*. 7. 804-10
- McVey, C. E., Walsh, M. A., Dodson, G. G., Wilson, K. S., Brannigan, J. A. **2001**. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. *J Mol Biol*. 313. 139-50
- Mielgo, I., Palma, C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M. **2003**. Covalent immobilisation of manganese peroxidases (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera* sp. BOS55. *Enzym microb technol*. 32. 769-775
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., Waldron, K. C. **2004**. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 37. 790-6, 798-802
- Monsan, P. **1978**. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *J. Mol. Catal*. 3. 371-384
- Mozhaev, V. V. **1993**. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol*. 11. 88-95
- Nam, D. H. K., Ryu, D.D.Y. **1985**. Reaction kinetics of cephalixin synthesizing enzyme from *Xanthomonas citri*. *Biotechnology and bioengineering*. 27. 953-960

- Nelson, D. P., Kiesow, L.A **1972**. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* . 49. 474-478
- Newton, G. G., Abraham, E. P. **1955**. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid. *Nature*. 175. 548
- Nikolov, A. A. **1994**. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-amino-cephalosporanic acid. Part II: Single-step procedure using a coimmobilized enzyme system. *Enzyme and microbial technology*. 16. 1037-1041
- Ö'fagain, C. C. **2003**. Enzyme stabilization - Recent experimental progress. *Enzym microb technol*. 33. 137-149
- Oh, B. B. **2003**. Deacylation activity of cephalosporin acylase to cephalosporin C is improved by changing the side-chain conformations of active-site residues. *Biochemical and biophysical research communications*. 310. 19-27
- Ohama, H., Sugiura, N., Tanaka, F., Yagi, K. **1977**. Effect of alcohols on the structure and function of D-amino-acid oxidase. *Biochemistry*. 16. 126-31
- Oinonen, C., Rouvinen, J. **2000**. Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci*. 9. 2329-37
- Onions, A. S., Brady, B.L., **1987**, Taxonomy of Penicillium and Acremonium. Acremonium, P. a., Biotechnonlogy Handbook 1., Plenum Press, NY, 1-35.
- Ospina, S., Barzana, E., Ramirez, O. T., Lopez-Munguia, A. **1996**. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzym microb technol*. 19. 462-469
- Otten, L. G., Sio, C. F., Vrielink, J., Cool, R. H., Quax, W. J. **2002**. Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the Beta -subunit. *J Biol Chem*. 277. 42121-7
- Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernandez-Lorente, G., Pernas, M., Rua, M. L., Guisán, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **2004**. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog*. 20. 630-5
- Palomo, J. M. M. o., G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. . **2002**. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B, Enzym*. 19-20. 279-286
- Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S. S., Kennedy, J. F. **1998**. Recent Trends in Enzymatic Conversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA). *Crit. Rev. Biotechnol*. 18. 1-12
- Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S. S., Kennedy, J. F. **2000**. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol Adv*. 18. 289-301

- Pessela, B. C., Mateo, C., Carrascosa, A. V., Vian, A., Garcia, J. L., Rivas, G., Alfonso, C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. **2003**. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged beta-galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy Sepabeads. *Biomacromolecules*. 4. 107-13
- Pilone, M. S. **2000**. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci*. 57. 1732-47
- Pollegioni, L., Caldinelli, L., Molla, G., Sacchi, S., Pilone, M. S. **2004**. Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: a comparison between proteins from different sources. *Biotechnol Prog*. 20. 467-73
- Pollegioni, L., Diederichs, K., Molla, G., Umhau, S., Welte, W., Ghisla, S., Pilone, M. S. **2002**. Yeast D-amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties. *J Mol Biol*. 324. 535-46
- Pollegioni, L., Lorenzi, S., Rosini, E., Marcone, G. L., Molla, G., Verga, R., Cabri, W., Pilone, M. S. **2005**. Evolution of an acylase active on cephalosporin C. *Protein Sci*. 14. 3064-76
- Prieto, M. A., Diaz, E., Garcia, J. L. **1996**. Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J Bacteriol*. 178. 111-20
- Raimondi, S., Monti, D., Forti, L., A. M., Riva, S. **2003a**. Kinetic resolutions of racemic amines and alcohols catalyzed by an industrial glutaryl-7-aminocephalosporanic acylase with unexpected broad substrate specificity. *Tetrahedron*. 14. 1091-1094
- Raimondi, S., Monti, D., Pagnoni, A. M., Riva, S. **2003b**. Glutaryl Acylase: One-Reaction Enzymes or Versatile Enantioselective Biocatalyst? *Advanced synth catal*. 345. 783-789
- Reyes, F., Martinez, M. J., Alfonso, C., Copa-Patino, J. L., Soliveri, J. **1990**. Cephalosporin C acylase in the autolysis of filamentous fungi. *J Pharm Pharmacol*. 42. 128-31
- Reyes, F., Martinez, M. J., Soliveri, J. **1989**. Determination of cephalosporin-C amidohydrolase activity with fluorescamine. *J. pharm. pharmacol*. 41. 136-137
- Rocchietti, S. S., Urrutia, A. S. V., Pregnotato, M., Tagliani, A., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Terreni, M. **2002**. Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase. *Enzyme Microb Technol*. 31. 88-93
- Roche, D., Prasad, K., Repic, O. **1999**. Enantioselectivity acylation of b-aminesters using penicillin G acylase in organic solvents. *Tetrahedron Lett*. 40. 3665-3668
- Rosell, C. M., Terreni, M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **1998**. A criterion for the selection of monophasic solvents for enzymatic synthesis. *Enzym microb technol*. 23. 64-69
- Salas, A. P., Zhu, L., Sanchez, C., Brana, A. F., Rohr, J., Mendez, C., Salas, J. A. **2005**. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase. *Mol Microbiol*. 58. 17-27

- Schoevaart, R., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. **2000**. A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol. *J. Org. Chem.* 65. 6940-6943
- Schoevaart, R., van Rantwijk, F.M., Sheldon, R.A. **1999**. Carbohydrates from glycerol: an enzymatic four step, one-pot synthesis. *Chem. Commun.* 24. 2465-2466
- Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P., van Rantwijk, F., van der Wielen, L. A., Sheldon, R. A. **2004**. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng.* 87. 754-62
- Schroen, C. G., Nierstrasz, V. A., Moody, H. M., Hoogschagen, M. J., Kroon, P. J., Bosma, R., Beeftink, H. H., Janssen, A. E., Tramper, J. **2001**. Modeling of the enzymatic kinetic synthesis of cephalixin--influence of substrate concentration and temperature. *Biotechnol Bioeng.* 73. 171-8
- Schroen, C. G. P. H., Nierstrasz, V. A., Kroon, P. J., Bosma, R., Janssen, A. E. M., Beeftink, H. H., Tramper, J. **1999**. Thermodynamically controlled synthesis of [beta]-lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. *Enzym microb technol.* 24. 498-506
- Shibuya, Y., Matsumoto, K, Fujii, T. . **1981**. Isolation and propierties of 7-b-(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase-producing bacteria. . *Agricultural and biological chemistry.* 45. 2225-2229
- Sio, C. F., **2005**, Mutant and homologs of cephalosporin acylase, RUG, *Groningen (Paises Bajos)*, 40-108
- Sio, C. F., Quax, W. J. **2004**. Improved beta-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol.* 15. 349-55
- Sio, C. F., Riemens, A. M., van der Laan, J. M., Verhaert, R. M., Quax, W. J. **2002**. Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Eur J Biochem.* 269. 4495-504
- Sudhakaran, V. K., Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S., Shewale, J.G. **1992**. Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases. *Process Biochem.* 27. 131-143
- Sundberg, S., Barrett, R., Piurrung, M., Lu, A., Kiangsoontra, N., Holmes, C. **1995**. Spatially-addressable immobilization of macromolecules on solid supports. *J. Am. Chem. Soc.* 117. 12050-12057
- Svedas, V. K., Margolin, A. L., Borisov, I. L., Berezin, I. V. **1980**. Kinetics of the enzymatic synthesis of benzylpenicillin. *Enzym microb technol.* 2. 313-317
- Swank, R. T., Munkres, K. D. **1971**. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem.* 39. 462-77
- Tan, Q., Song, Q., Wei, D. **2006**. Single-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid using cell-bound and support-bound enzymes. *Enzym microb technol.* 39. 1166-1172

- Terreni, M. M. T., J.G., Sarnataro, U., Rocchietti, S., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. . **2005a**. Influence of substrate structure on PGA-catalyzed acylations. Evaluation of different approaches for the enzymatic synthesis of cefonicid. *Adv. synth. catal.* 347. 121-128
- Terreni, M. M. U., D., Pagani, G., Hernández-Jústiz, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. . **2005b**. Penicillin G acylase catalyzed acylation of 7-ACA in aqueous two-phase systems using kinetically and thermodynamically controlled strategies: Improved enzymatic synthesis of 7-[(1-hydroxy-1-phenyl)-acetamido]-3-acetoxymethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylic acid *Enzym microb technol.* 36. 672-679
- Tewari, Y. B.,Goldberg, R. N. **1988**. Thermodynamics of the conversion of penicillin G to phenylacetic acid and 6-aminopenicillanic acid. *Biophys Chem.* 29. 245-52
- Tomasz, A. **1979**. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 33. 113-37
- Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J. M., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Tam, A.,Daminati, M. **2002**. Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: optimization of the biocatalyst's stability. *Biotechnol Prog.* 18. 1221-6
- Torres, R., Pessela, B., Fuentes, M., Munilla, R., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R.,Guisan, J. M. **2005**. Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports. *J Biotechnol.* 120. 396-401
- Torres, R., Pessela, B. C., Mateo, C., Ortiz, C., Fuentes, M., Guisan, J. M.,Fernandez-Lafuente, R. **2004**. Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnol Prog.* 20. 1297-300
- Trasvascio, P., Zito, E., Portaccio, M., Diano, V., Di Martino, S. **2002**. Enzyme reaction engineering: effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal an non-isothermal conditions. *Biotechnol. Prog.* 18. 975-985
- Trevar, M. D.,**1980**,Immobilized enzymes.,LTD., J. W. a. S.,*England*,11-22.
- Tukel, S. S.,Alptekin, O. **2004**. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochemistry.* 39. 2149-2155
- Ulijn, R. V., De Martin, L., Halling, P. J., Moore, B. D.,Janssen, A. E. **2002**. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics via direct condensation. *J Biotechnol.* 99. 215-22
- Valle, F., Balbas, P., Merino, E.,Bolivar, F. **1991**. The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends Biochem Sci.* 16. 36-40
- van de Velde, F., Lourenco, N. D., Bakker, M., van Rantwijk, F.,Sheldon, R. A. **2000**. Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotechnol Bioeng.* 69. 286-91
- Verhaert, R. M., Riemens, A. M., van der Laan, J. M., van Duin, J.,Quax, W. J. **1997**. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. *Appl Environ Microbiol.* 63. 3412-8

- Wegman, M. A., Janssen, M.H.A. van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. **2001**. Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Advanced synth. catal.* 343. 559-576
- Wegman, M. A., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. **2002**. A two-step, one-pot enzymatic synthesis of cephalexin from D-phenylglycine nitrile. *Biotechnol Bioeng.* 79. 356-61
- Wheatley, J. B., Schmidt, D. E., Jr. **1999**. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. *J Chromatogr A.* 849. 1-12
- Wilkinson, B., Bachmann, B. O. **2006**. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration. *Curr Opin Chem Biol.* 10. 169-76
- Wilson, L., Betancor, L., Fernandez-Lorente, G., Fuentes, M., Hidalgo, A., Guisan, J. M., Pessela, B. C., Fernandez-Lafuente, R. **2004a**. Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: a simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules.* 5. 814-7
- Wilson, L., Illanes, A., Abian, O., Pessela, B. C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. **2004b**. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: an easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules.* 5. 852-7
- Wong, S. S., Wong, L.J.C. **1992**. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzym microb technol.* 14. 866-874
- Youshko, M. I., Chilov, G. G., Shcherbakova, T. A., Svedas, V. K. **2002a**. Quantitative characterization of the nucleophile reactivity in penicillin acylase-catalyzed acyl transfer reactions. *Biochim Biophys Acta.* 1599. 134-40
- Youshko, M. I., Svedas, V. K. **2000**. Kinetics of ampicillin synthesis catalyzed by penicillin acylase from *E. coli* in homogeneous and heterogeneous systems. Quantitative characterization of nucleophile reactivity and mathematical modeling of the process. *Biochemistry (Mosc).* 65. 1367-75
- Youshko, M.I., van Lagen, L.M., De Vroom, E., Moody, H.M., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Svedas, V.K. **2000b**. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in 'aqueous solution-precipitate' systems. High substrate concentration and supersaturation effect. *J.Mol. Catal.B-Enzym.* 10.509-515
- Youshko, M. I., van Langen, L. M., de Vroom, E., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., Svedas, V. K. **2002b**. Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: a new approach to optimization. *Biotechnol Bioeng.* 78. 589-93
- Youshko, M. I. M., H.M., Bukhanov, A.L., Boosten, W.H.J., Svedas, V.K. **2004**. Penicillin Acylase-Catalyzed Synthesis of β -Lactam Antibiotics in Highly Condensed Aqueous Systems: Beneficial Impact of Kinetic Substrate Supersaturation *Biotechnol Bioeng.* 85. 323-329
- Zaks, A. **2001**. Industrial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol.* 5. 130-6
- Zhou, Q. Z. K., Chen. X.D. **2001**. Immobilization of [beta]-galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J, Food Engine.* 48. 69-74